

EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE DE PIGMENTOS TIPO ANTOCIANINA PRESENTES EN
EL FRUTO DE LA MORA (*Rubus urticaefolius* *poir R.*)

SILVIA MARCELA ENRÍQUEZ GARCÍA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2014

EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE DE PIGMENTOS TIPO ANTOCIANINA PRESENTES EN EL
FRUTO DE LA MORA (*Rubus urticaefolius* *poir* R.)

SILVIA MARCELA ENRÍQUEZ GARCÍA

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

DIRECTOR:
NELSON HUMBERTO HURTADO GUTIERREZ
Ph. D. en Ciencias Químicas.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2014

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

Artículo 1º del acuerdo No. 324 del 11 de Octubre de 1966, emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación:

Nelson Humberto Hurtado Gutiérrez
Asesor

José Hipólito Isaza Martínez
Jurado

Juan Pablo Jiménez Mora
Jurado

San Juan de Pasto, Marzo de 2014.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por ser lámpara a mis pies y lumbrera a mi camino.

Al Dr. Nelson Hurtado director del GIPIB por su asesoría en esta investigación.

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

Al Dr. Francisco Heredia de la Universidad de Sevilla, por la ayuda brindada en el estudio del color.

A los químicos Juan Pablo Jiménez y David Arturo, encargados del laboratorio de análisis instrumental de la Universidad de Nariño.

A los jurados: Dr. José Hipólito Isaza y Juan Pablo Jiménez, por el tiempo dedicado a la evaluación de este trabajo.

A mi familia y amigos compañeros del GIPIB.

DEDICATORIA

A mi *Padre DIOS* que está en los Cielos, el autor y dador de la vida, creador de todo y de este sueño. A *Jesucristo* mi hermano mayor, que siempre ha dirigido mis pasos por la senda correcta. Al *Espíritu Santo*, mi mejor amigo, el confidente más fiel que puede existir, por ser mi fortaleza en todo tiempo.

A mi papá Álvaro por ser mi modelo a seguir, esforzado y valiente.

A mi mamá Luz Dary por ser una mujer virtuosa, llena de valores que me ha enseñado como vivir.

A mis hermanos Mauricio e Ignacio, dos grandes matemáticos, que con sus experiencias han enriquecido mi camino.

RESUMEN

En este trabajo de investigación se realizó la extracción, la identificación y el estudio de la capacidad antioxidante de los pigmentos tipo antocianina del fruto de la mora (*Rubus urticaefolius* *poir R.*) en donde se logró obtener a partir de la fruta, un extracto crudo que a su vez por medio de adsorción selectiva sobre Amberlita XAD-7 se consiguió un extracto rico en polifenoles. El extracto enriquecido se analizó por HPLC-PDA. Con el propósito de facilitar la purificación de los pigmentos por HPLC semi-preparativa se aislaron las antocianinas monoméricas de las poliméricas por cromatografía de exclusión por tamaño. Cada fracción se analizó por HPLC-MS, con el fin de identificar las antocianinas. Se logró identificar a la Cianidina-3-O-glucósido y Cianidina 3-O-rutinósido como componentes mayoritarios del fruto de la mora.

Se pudo determinar que el fruto de la Mora tiene un contenido total de compuestos fenólicos, de antocianinas monoméricas y de antocianinas poliméricas mayor que frutas comerciales como la uva, la guayaba y la fresa.

La actividad antioxidante de los extractos de la mora frente al radical ABTS^{•+} se estudió a través del método capacidad antioxidante equivalente a trolox, en donde se observó que el extracto crudo (ECR), presentó mayor capacidad antioxidante que el extracto rico en polifenoles y entre las antocianinas purificadas, la antocianina **a**, tuvo mayor actividad antioxidante. Los extractos de la mora se clasificaron como antioxidantes con eficiencia anti-radical baja, el EPR y la antocianina **c** presentan la mayor eficiencia anti-radical.

Adicionalmente se estudió mediante la colorimetría triestímulo como cambia el color al variar el pH de los extractos. Se corroboró que el pH es un factor que afecta el color. Los resultados mostraron que el color más puro en el rango ácido se encontró a pH 1,06.

ABSTRACT

In this work of investigation there realized the extraction, the identification and the study of the antioxidant capacity of the pigments type anthocyanin of the blackberry fruit (*Rubus urticaefolius* *poir* R.) where it was achieved to obtain from the fruit, a raw extract that in turn by means of selective adsorption on Amberlita XAD-7 obtained a rich extract in polyphenols. The enriched extract was analyzed by HPLC-PDA. With the intention of facilitating the purification of the pigments for HPLC semi-preparativa the monomeric anthocyanins of the polymeric anthocyanins were isolated by chromatography of exclusion by size. Every fraction was analyzed by HPLC-MS, in order to identify the anthocyanin. It was achieved to identify the Cyanidin-3-O-glucoside and Cyanidin-3-O-rutinoside as majority components of the fruit of the default.

It was possible to determine that the blackberry fruit has a total content of phenolic compounds, of monomeric anthocyanins and polymeric anthocyanins major that commercial fruits like the grape, the guava and the strawberry.

The antioxidant activity of the extracts of the blackberry fruit opposite to the radical ABTS^{•+} studied across the method Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) where was observed that the raw extract (ECR), he presented major antioxidant capacity that the rich extract in polyphenols and between the purified anthocyanin, **a**, it had major antioxidant activity. The extracts of the blackberry qualified like antioxidant with anti-radical low efficiency, the EPR and the anthocyanin **c** present the major anti-radical efficiency.

Additional it was studied by means of the colorimetry triestímulo since the color changes on having changed the pH of the extracts. There was corroborated that the pH is a factor that affects the color. The results showed that the purest color in the acid range was to pH 1,06.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN.	16
1. OBJETIVOS.	17
1.1 Objetivo general.	17
1.2 Objetivos específicos.	17
2. MARCO REFERENCIAL.	18
2.1 Antecedentes.	18
2.2 MARCO CONTEXTUAL.	20
2.3 MARCO TEÓRICO.	20
2.3.1 Pigmentos de origen natural.	20
2.3.1.1 Flavonoides	21
2.3.2 Antocianinas.	22
2.3.2.1 Estructura de las antocianinas.	23
2.3.2.2 Factores químicos que determinan el color y la estabilidad de las antocianinas.	28
2.3.2.3 Métodos de extracción, separación y purificación de antocianinas.	29
2.3.2.4 Métodos de cuantificación.	29
2.3.2.5 Métodos de caracterización de antocianinas.	31
2.3.3 Capacidad antioxidante.	31
2.3.3.1 Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante in – vitro.	32
2.3.4 Aplicación de colorimetría triestímulo en antocianinas.	35
2.3.5 Actividad biológica de las antocianinas.	36
3. METODOLOGÍA	38
3.1 Equipos y reactivos.	38
3.1.1 Equipos.	38
3.1.2 Reactivos.	39
3.2 Muestreo.	39
3.3 Obtención del extracto crudo.	39
3.4 Obtención del extracto rico en polifenoles.	39
3.5 Separación de antocianinas monoméricas y poliméricas.	39
3.6 Análisis de antocianinas por HPLC-analítica.	40
3.7 Determinación de fenoles totales.	40
3.8 Identificación de antocianinas mayoritarias.	40
3.8.1 Determinación de antocianinas monoméricas totales.	40
3.8.2 Determinación de antocianinas poliméricas.	40
3.9 Determinación de la capacidad antioxidante.	41
3.9.1 Método de capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC).	41
3.9.2 Determinación de la eficiencia anti-radical.	42
3.9.3 Estabilidad del color.	42
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	43
4.1 Clasificación y características de la planta.	43

4.1.1 Preparación de la muestra	43
4.2 Ensayos preliminares.	43
4.3 Tratamiento de la muestra.	44
4.4 Cuantificación.	45
4.4.1 Determinación de antocianinas monoméricas totales.	45
4.4.2 Determinación de antocianinas poliméricas.	47
4.4.3 Determinación de fenoles totales.	48
4.5 Purificación de antocianinas.	50
4.6 Caracterización por cromatografía de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).	56
4.7 Capacidad antioxidante.	59
4.7.1 Método de capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC).	59
4.7.2 Determinación de la eficiencia anti-radical.	62
4.8 Análisis del color.	68
CONCLUSIONES	71
RECOMENDACIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	73
ANEXOS	79

LISTA DE TABLAS

	Pág.	
Tabla 1.	Clasificación de flavonoides.	22
Tabla 2.	Variaciones en la sustitución del anillo B de las antocianidinas.	24
Tabla 3.	Sustituyentes de la estructura química de la antocianina.	25
Tabla 4.	Contenido de antocianinas monoméricas.	46
Tabla 5.	Contenido total de antocianinas en variedad de frutos.	46
Tabla 6.	Contenido de antocianinas poliméricas para el extracto crudo y para el purificado.	47
Tabla 7.	Datos curva de calibración.	48
Tabla 8.	Fenoles totales para los ECR y EPR.	49
Tabla 9.	Tiempos de retención y porcentaje de área de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto purificado (EPR).	51
Tabla 10.	Tiempos de retención y porcentaje de área de los compuestos mayoritarios presentes en la primera fracción obtenida por sephadex.	53
Tabla 11.	Tiempos de retención y porcentaje de área de los compuestos mayoritarios presentes en la segunda fracción obtenida por sephadex.	53
Tabla 12.	Tiempos de retención y porcentaje de área de los compuestos mayoritarios presentes en la tercera fracción obtenida por sephadex.	53
Tabla 13.	Parámetros espectroscópicos de las antocianinas puras.	55
Tabla 14.	Absorbancias de los extractos y de las antocianinas puras en la prueba con el catión radical ABTS ⁺ .	60
Tabla 15.	Resultados de TEAC.	61
Tabla 16.	Eficiencia anti-radical para patrones de ácido ascórbico.	63
Tabla 17.	Eficiencia anti-radical (EA) de los extractos y las antocianinas presentes en el fruto de la Mora.	67
Tabla 18.	Variación de los parámetros del color con respecto al pH.	69

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Estructura básica de los flavonoides.	21
Figura 2.	Estructura de las antocianidinas.	24
Figura 3.	Estructura química de antocianina.	25
Figura 4.	Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH	27
Figura 5.	Reacción de las antocianinas con bisulfito para formar antocianinas sulfónicas incoloras	30
Figura 6.	(a) Formación del radical ABTS (b) Reacción del catión radical ABTS ^{•+} con compuestos fenólicos.	33
Figura 7.	(a) DPPH ₂ . Molécula neutra, no radical de 2,2 – Difenil-1-picrilhidrazina. (b) Molécula radical DPPH [•] .	34
Figura 8.	Cromatógrafo –HPLC Waters 1525.	40
Figura 9.	Planta de Mora <i>Rubus urticaefolius</i> <i>poir</i> R.	43
Figura 10.	Variación del color del extracto de Mora con respecto al pH.	44
Figura 11.	Espectro UV-Vis del extracto de Mora.	44
Figura 12.	Maceración química del fruto.	44
Figura 13.	Columna cromatográfica cargada con resina XAD-7. (b) Concentración del extracto rico en polifenoles.	45
Figura 14.	(a) Extracto ECR (b) Extracto EPR.	45
Figura 15.	Perfil cromatográfico de la fracción purificada por resina XAD-7 con máximo de absorción a 520 nm.	50
Figura 16.	Separación de antocianinas monoméricas y poliméricas.	51
Figura 17.	Perfil cromatográfico de la primera fracción monomérica purificada por sephadex con máximo de absorción a 520 nm.	52
Figura 18.	Perfil cromatográfico de la segunda fracción monomérica separada por sephadex con máximo de absorción a 520 nm.	52
Figura 19.	Perfil cromatográfico de la tercera fracción monomérica separada por sephadex con máximo de absorción a 520 nm.	53
Figura 20.	Perfiles cromatográficos de los componentes mayoritarios purificados.	54
Figura 21.	Espectro UV -Vis de la Antocianina a purificada por HPLC-PDA.	54
Figura 22.	Espectro UV-Vis de la Antocianina b purificada por HPLC-PDA.	55
Figura 23.	Espectro UV-Vis de la Antocianina c purificada por HPLC-PDA.	55
Figura 24.	Espectros de masas de las señales a, b y c.	57
Figura 25.	Estructura tentativa de la antocianina a	58

Figura 26.	Estructura de Cianidina-3-O-glucósido.	58
Figura 27.	Estructura de Cianidina-3-O-rutinósido.	59
Figura 28.	Espectro UV-Vis de la mora a pH 1.	68
Figura 29.	Diagrama de cromaticidad del espacio de color $L^* a^* b^*$ (Matiz y saturación)	68
Figura 30.	Cambios de color del rango de pH ácido al básico.	69
Figura 31.	Cambios en (a) el croma (C^*ab), (b) claridad (L^*); y (c) el tono (hab) del extracto crudo de Mora con respecto al pH en el rango ácido.	70

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Comparación del contenido total de antocianinas en variedad de frutos	47
Gráfica 2. Recta de calibrado de ácido gálico.	48
Gráfica 3. Comparación del contenido de fenoles totales en diferentes frutos.	50
Gráfica 4. Recta de calibración para determinar la capacidad antioxidante en TEAC.	59
Gráfica 5. Porcentaje de Inhibición para cada uno de los extractos y las antocianinas purificadas.	60
Gráfica 6. Comparación de la capacidad antioxidante TEAC del fruto de la Mora con otros frutos.	61
Gráfica 7. Recta de calibración DPPH [*] .	62
Gráfica 8. Comportamiento de diferentes concentraciones de ácido ascórbico frente al radical DPPH [*] .	62
Gráfica 9. Curva para determinar el EC_{50} con diferentes concentraciones de ácido ascórbico.	63
Gráfica 10. Cinética de reacción para los diferentes extractos.	64

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Gráficas para calcular el EC_{50}	79

GLOSARIO

ABTS ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico

$A_{\lambda_{vis-max}}$ Absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción en la región visible.

A_{440} Absorbancia a 440 nm.

Cy-3-glu Cianidina-3-glucósido.

DPPH 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo.

ECR Extracto crudo.

EPR Extracto purificado.

ESI-MS Espectrometría de masas por ionización electrospray.

HPLC Cromatografía líquida de alta eficiencia.

HPLC-PDA Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de fotodiodos.

HPLC-MS Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas.

TEAC Capacidad antioxidante equivalente a trolox.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha intensificado el estudio, desarrollo y proyección comercial de pigmentos en Colombia obtenidos de fuentes naturales provenientes de plantas, hongos ó insectos, Este tipo de colorantes tienen cada vez mas aprobación debido no solo a sus comprobadas propiedades nutraceuticas sino también porque los colorantes que actualmente tienen mayor uso (sintéticos) ocasionan efectos secundarios que afectan la salud humana.

En la región andina se encuentra una buena diversidad de plantas y frutos los cuales tienen una gran demanda por sus propiedades y actividad biológica de sus metabolitos secundarios. Dentro de esta clase de compuestos se encuentran los pigmentos presentes en las hojas, frutos y flores. Es de nuestro interés estudiar los pigmentos obtenidos a partir del fruto de la Mora (*Rubus urticaefolius* poir R.) debido a que en otras especies de Mora como *Rubus glaucus* ya se han reportado altos contenidos de pigmentos con actividad antioxidante. La materia prima básica de esta investigación es el fruto de un material vegetal silvestre lo cual constituye un gran aporte para los esfuerzos en bioprospección y uso racional de los recursos.

Como contribución al estudio de frutales (bioprospección del fruto de la mora), los compuestos que aportan al color serán abordados en esta propuesta. En las plantas existen diversos tipos de pigmentos, estos según su estructura se pueden clasificar en clorofilas, carotenoides, betalainas y antocianinas, cada uno es identificado por un espectro de absorción y una longitud de onda de máxima absorción características. Este atributo es uno de los que se emplea en su identificación y cualificación ya sea cuando son previamente aislados en columnas cromatográficas, o analizados mediante HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia). Dentro de los diversos pigmentos de origen natural las antocianinas son un tipo de compuestos responsables de los colores rojo, violeta y azul de la mayoría de frutos y flores, este tipo de compuestos pertenecen a la familia de los flavonoides y poseen en su estructura molecular diversos grupos hidroxilo sobre sistemas aromáticos (polifenoles) que los hace buenos antioxidantes.

Desde esta perspectiva, en este proyecto de investigación se extrajeron los pigmentos tipo antocianina, se identificaron los componentes mayoritarios, y se estudió la capacidad antioxidante de los extractos de polifenoles del fruto, este estudio se realizó el *grupo de investigación en productos de importancia biológica* GIPIB de la Universidad de Nariño.

1. OBJETIVOS.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad antioxidante de los pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto de la Mora (*Rubus urticaefolius* *poir R.*)

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Extraer e identificar las antocianinas mayoritarias presentes en el fruto de la Mora (*Rubus urticaefolius* *poir R.*)
- ❖ Determinar el contenido fenólico y antociánico de los extractos obtenidos de la Mora (*Rubus urticaefolius* *poir R.*)
- ❖ Cuantificar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de la Mora (*Rubus urticaefolius* *poir R.*)

2. MARCO REFERENCIAL.

2.1 ANTECEDENTES.

Se han encontrado numerosas publicaciones acerca de la extracción, la purificación, identificación y estudio de la capacidad antioxidante de antocianinas en variedades de mora en diferentes partes del mundo, sin embargo no se ha reportado en la actualidad la identificación y el estudio de capacidad antioxidante del fruto de la mora (*Rubus urticaefolius* poir R.).

A continuación se presentan algunos de los trabajos realizados en diferentes variedades de mora.

Elisia, Hu y colaboradores¹ trabajaron con una variedad de mora identificada como *Rubus fruticosus* sp. El extracto etanólico obtenido fue empleado para conseguir un extracto enriquecido en antocianinas por medio de cromatografía de filtración en gel al que se estudió su contenido total de antocianinas y se identificó a la cianidina-3-glucósido como la antocianina mayoritaria en este fruto, también se evaluó la capacidad antioxidante y los resultados indicaron que la presencia de esta antocianina contribuye con una parte importante de la capacidad antioxidante para suprimir radicales peroxilo inducidos químicamente y por oxidación intracelular.

En Turquía² se hizo un estudio de la composición química de *Morus alba* L. (blanca) *Morus rubra* L. (roja) y *Morus nigra* L. (negra) en donde se evidencia un alto contenido de fenoles totales para estas tres especies encabezado por *Morus nigra*.

Özgen³ y colaboradores investigaron diferentes parámetros de interés de *Morus rubra* L. (roja) y *Morus nigra* L. (negra) como fenoles totales (TP), el contenido total de antocianinas monoméricas (TMA), acidez titulable (AT), también se determinó la capacidad antioxidante total (TAC) de los frutos por medio del método (TEAC). *Morus nigra* presentó mayor TP, TMA, AT y TAC en comparación a *Morus rubra*.

¹ELISIA, I; HU, C; POPOVICH, D; KITTS, D. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. En: Food Chemistry. Vol. 101, (Feb. 2007); p.1052-1058.

²ERCISLI, S; ORHAN E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. En: Food Chemistry. Vol. 103, (Oct 2006); p. 1380-1384.

³OZGEN, M; SERCE, S; KAYA, C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. En: Scientia Horticulturae. Vol. 119, (Ago. 2008); p. 275-279.

En China, Q. Du, J. Zheng y Y. Xu⁴, extrajeron y separaron antocianinas de *Morus alba L.* por cromatografía en contracorriente de alta velocidad identificando cinco antocianinas mayoritarias: cianidina 3-O-(6''-O- α -ramnopiranosil- β -D-glucopiranosido), cianidina 3-O-(6''-O- α -ramnopiranosil- β -D-galactopiranosido), cianidina 3-O- β -D-glucopiranosido, cianidina 3-O- β -D-galactopiranosido y cianidina 7-O- β -D-glucopiranosido. También se evaluó la capacidad antioxidante por medio de la eliminación de radicales libres demostrando así que las antocianinas de *Morus alba L.* son excelentes agentes antioxidantes.

Por otra parte Liuqing Yang⁵ en su investigación reportó la extracción, identificación y estudio de la capacidad antioxidante de *Morus atropurpurea Roxb.* La extracción se llevó a cabo por medio de una extracción acuosa en dos fases (ATPE). El diferencial de partición óptimo de antocianinas y azúcares se logró mediante este método a pH 4,5 y 35 ± 1 °C, usando 30% de etanol, sulfato de amonio al 20%, 10% de jugo de mora y 40% de agua, donde el 85,1% de antocianinas repartió a la fase superior y 89,5% de azúcares se observaron en la fase inferior. Por otra parte, en una sola etapa de extracción se pudo eliminar con éxito la mayoría de los azúcares libres y retener la mayor parte de las antocianinas. El análisis por HPLC-ESI-MS/MS mostró que las antocianinas presentes en *Morus atropurpurea Roxb* son cianidina-3-O-glucósido, cianidina-3-O-rutinósido, delfinidina-3-rutinósido, delfinidina-3-(6'malonoyl)-glucósido y peonodina-3-xilosilramnosido. La ATPE no afectó a la composición de la mezcla de antocianinas, y el extracto mostró una actividad antioxidante relativamente alta en comparación con la extracción convencional. Este trabajo sugirió que ATPE es el método de purificación de antocianinas en un solo paso, que no sólo elimina la mayoría de los azúcares para mejorar la pureza de antocianinas, sino que también acorta el tiempo de procesamiento y reduce el costo.

Vaillant⁶ y colaboradores compararon moras cultivadas en climas templados, las moras de países tropicales (*R. adenotrichus*) presentan alto contenido de elagitaninos y bajo contenido de antocianinas. Aun así, la fruta presenta una capacidad antioxidante relativamente alta, que puede ser explicada por efectos sinérgicos entre compuestos fenólicos. La mora de montaña tropical en este estudio es sobresaliente entre las diferentes variedades de mora. Según Scalzo⁷ se debe tener en cuenta que las propiedades antioxidantes de los frutos se ven

⁴ DU, Q; ZHENG, J; XU, Y. Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity. En: Journal of Food Composition and Analysis. Vol. 21, (2008); p. 390-395.

⁵ WU, X; LINGHONG, L; ZOU, Y; ZHAO, T; ZHAO, J; LI, F; YANG, L. Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea Roxb.*). En: Food Chemistry. Vol. 129, (2011); p. 443-453.

⁶ VAILLANT, F; ACOSTA-MONTOYA, O; COZZANO, S. S; MERTZ, C; PÉREZ, A; CASTRO, M. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus Schlttdl.*) during three edible maturity stages. En: Food Chemistry. Vol. 119, (2009); p 1497-1501.

⁷ SCALZO, J; POLITI, A; PELLEGRINI, N; MEZZETTI, B; BATTINO, M. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol. 21, (2005); p. 207-213.

fuertemente afectadas por el tipo de fruta (especies y la variedad dentro de cada especie), y las condiciones de cultivo de la planta.

2.2 MARCO CONTEXTUAL.

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La Mora (*Rubus urticaefolius* *poir R.*) es originaria de las zonas altas tropicales de América principalmente en Colombia, Ecuador, Panamá, Guatemala, Honduras, México y Salvador. El género *Rubus* es uno de los de mayor número de especies en el reino vegetal. Se encuentran diseminadas en casi todo el mundo excepto en las zonas desérticas⁸.

Descripción botánica: Es una planta de vegetación perenne, de porte arbustivo semierecto, conformada por varios tallos espinosos que pueden crecer hasta tres metros. Las hojas tienen tres folíolos, ovoides de 4 a 5 centímetros de largo con espinas ganchudas. Los tallos son espinosos con un diámetro entre 1 a 2 centímetros y de 3 a 4 metros de longitud. Tanto los tallos como las hojas están cubiertos por un polvo blanquecino. Los peciolo también tienen espinas, de color blanco y son de forma cilíndrica. En la base de la planta se encuentra la corona de donde se forman los tallos la cual esta conformada por una gran cantidad de raíces superficiales. El sistema radicular es profundo, puede llegar a profundizar más de un metro dependiendo del suelo y el subsuelo.

Las inflorescencias se presentan en racimos terminales aunque en ocasiones se ubican en las axilas de las hojas. La fruta es esférica o elipsoidal de tamaño variable, 1,5 a 2,5 cm. en su diámetro más ancho, de color verde cuando se están formando, pasando por un color rojo hasta morado oscuro cuando se maduran.

2.3 MARCO TEÓRICO.

2.3.1 Pigmentos de origen natural.

Son sustancias naturales que imparten color y se encuentran en las células y los tejidos de plantas y animales. Un tinte es un colorante certificado por la FDA (Food and Drug Administration, administración de fármacos y alimentos) de los Estados Unidos, con cierto grado de solubilidad en agua y utilizado en alimentos. También pueden utilizarse los colorantes exentos de certificación, conocidos como colorantes naturales⁹. Como ejemplos de pigmentos en tejidos animales se encuentran los compuestos hemo como la hemoglobina, responsable del color de

⁸ BIANCHINI, R.S. Rosaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro [en línea] <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br.htm>>. 20 de Noviembre de 2012.

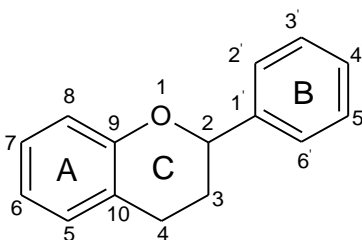
⁹ SALDAÑA M., Efecto de la copigmentación sobre la expresión de color en sistemas modelo de ciruela (*Prunus domestica*), Puebla (México) 2004. Trabajo de grado (Licenciatura en quimicofarmacobiología). Escuela de ciencias, Universidad Las Américas. p. 123.

la carne. Esta contiene en su estructura hierro y un anillo de porfirina. Entre los pigmentos vegetales están las clorofilas, que son pigmentos encontrados también en algas y bacterias fotosintéticas, los carotenoides, que varían su coloración del amarillo al anaranjado y son sintetizados por algunas plantas, presentando funciones importantes en la fotosíntesis y la fotoprotección de los tejidos, las betalainas, que tienen coloraciones del rojo al amarillo, los flavonoides tipo antocianina, que proporcionan los colores azul rojo y violeta a los frutos, flores y hojas en la mayoría de las plantas.

2.3.1.1 Flavonoides.

Los flavonoides son un gran grupo de sustancias vegetales que fueron descubiertas por el premio Nobel en Bioquímica Dr. Albert Szent-Gyorgi, quien les denominó como "vitamina P". El Dr. Szent-Gyorgi descubrió que los flavonoides favorecen la función de la vitamina C, mejorando su absorción y protegiéndola de la oxidación. Los flavonoides comprenden varias clases de sustancias naturales, entre las cuales están muchas de las que les confieren colores: amarillo, naranja, rojo, violeta y azul, a muchas flores, hojas y frutos, especialmente. Tienen una estructura química muy definida como se muestra en la figura 1. Puede observarse que de manera general son moléculas que tienen dos anillos bencénicos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, los autores los denominan simplemente como compuestos C6-C3-C6¹⁰. El anillo A es un derivado de la cadena policetídica, el anillo B es derivado del ácido shikímico y los tres átomos de carbono que unen los anillos A y B, corresponden a la parte alquílica del fenilpropano.

Figura 1. Estructura básica de los flavonoides¹¹.

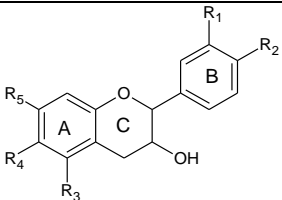
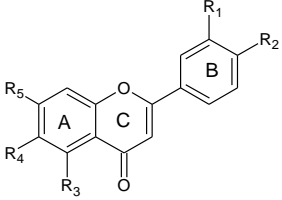
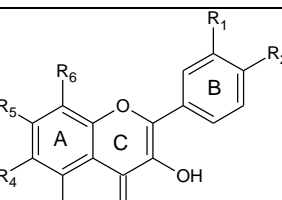
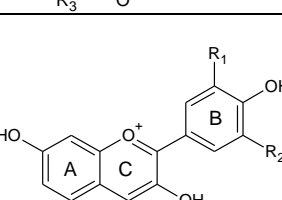


¹⁰ MARTINEZ A. Flavonoides. Medellín, 2005. Universidad de Antioquia, Facultad de química farmacéutica. p. 76

¹¹ PEREZ T. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. En: Revista cubana de investigaciones biomédicas. Vol. 22, (2003); p. 48-57.

En la siguiente tabla se muestra la clasificación de los flavonoides en función de las características estructurales¹²

Tabla 1. Clasificación de flavonoides.

Nombre	Descripción	Estructura Base	Ejemplos
Flavanos	Con un grupo –OH en posición 3 del anillo C.		Catequina
Flavonas	Poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.		Crisina, Acacetina, Diosmetina
Flavonoles	Grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C.		Galangina, Herbacetina, Quercetina
Antocianidinas	Tiene un grupo –OH unido en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.		Cianidina, Peonidina, Delfindina

2.3.2 Antocianinas.

Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano¹³. Estos pigmentos son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul en varias frutas, vegetales y cereales, acumulados en las vacuolas de la célula. Las antocianinas poseen diferentes funciones en la planta como son la atracción de

¹²MARTÍNEZ FLÓREZ, S; GONZÁLEZ GALLEGU J. Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. En: Nutrición Hospitalaria. Vol. 17, (2002); p. 271-278.

¹³HARBORNE, J; WILLIAMS, C. Advances in flavonoid research since 1992. En: Phytochemistry. Vol. 55, (2000); p. 481-504

polinizadores para la posterior dispersión de semillas y la protección de la planta contra los efectos de la radiación ultravioleta y contra la contaminación viral y microbiana. El interés por los pigmentos antocianicos e investigación científica se han incrementado en los últimos años, debido no solamente al color que confieren a los productos que las contienen sino a su probable papel en la reducción de las enfermedades coronarias, cáncer, diabetes; a sus efectos antiinflamatorios y mejoramiento de la agudeza visual y comportamiento cognitivo. Por lo tanto, además de su papel funcional como colorantes, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano. A pesar de las ventajas que ofrecen las antocianinas como sustitutos potenciales de los colorantes artificiales, factores como su baja estabilidad y la falta de disponibilidad de material vegetal limitan su aplicación comercial¹⁴. Las Antocianinas, son un grupo de compuestos fenólicos existentes ampliamente en el reino vegetal, presentan un espectro que va del color naranja al azul. Poseen propiedades farmacológicas conocidas y utilizadas son con fines terapéuticos (Smith, Marley, Seigler, Singletary, y Meline, 2000, Wang et al, 2000; Cooke, Steward, Gescher, y Marczylo, 2005; Pérgola, Rossi, Dugo, Cuzzocrea, y Sautebin, 2006) por lo que estos compuestos se han observado no sólo como colorante de alimentos, sino también como un aporte alimenticio para la salud¹⁵.

2.3.2.1 Estructura de las antocianinas.

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 carbonos. Están formadas por una estructura base llamada aglicona o antocianidina cuya estructura es un esqueleto de quince carbonos (C6-C3-C6). La gran mayoría de las antocianidinas se derivan de las seis más comunes; delfinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina, y malvidina. Éstas solo difieren en el lugar de la hidroxilación y metoxilación en el anillo B¹⁶. Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas.

¹⁴ WROLSTAD, R; ROBERT, W; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. En: Food science and technology. Vol.16, (2005); p. 423-428.

¹⁵ YANG, Z; ZHAI, W. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays L.*). En: Innovative Food Science and Emerging Technologies. Vol.11, (2009); p.169-176.

¹⁶ HYOUNG, S; LEE, V. Chromatographic analysis of anthocyanins. En: Color Research & Application. Vol. 19, No 6, (1994); p. 484-485.

Figura 2. Estructura de las antocianidinas¹⁷

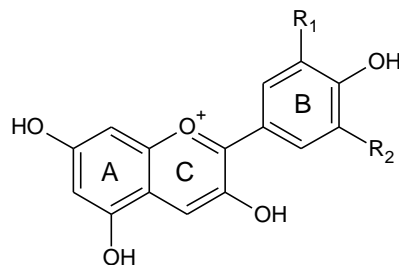


Tabla 2. Variaciones en la sustitución del anillo B de las antocianidinas.

Aglicona	Sustitución		λ_{\max} /(nm) espectro visible
	R ₁	R ₂	
Pelargonidina	H	H	494 (anaranjado)
Cianidina	OH	H	506 (anaranjado-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH ₃	H	506 (anaranjado-rojo)
Petunindina	OCH ₃	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	510 (azul-rojo)

En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzoico. Stintzing¹⁸ demostró que el tipo de sustitución glicosídica y de acilación producen efectos en el tono de las antocianinas; es así como sustituciones glicosídicas en la posición 5 al igual que acilaciones aromáticas, producen un desplazamiento hacia las tonalidades púrpura.

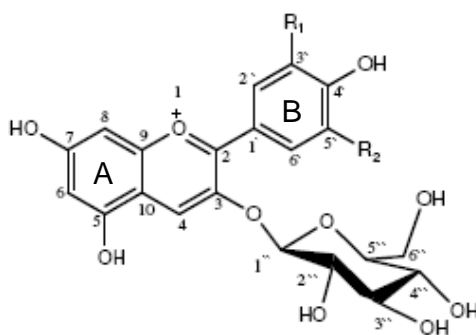
¹⁷DURST, R; WROLSTAD, RE. Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. En: Handbook of Food Analytical Chemistry. New Jersey: John Wiley & Sons; 2001. p. 33-45.

¹⁸STINTZING, FC; STINTZING, AS; CARLE, R; FREI, B; WROLSTAD, R. Color and Antioxidant Properties of Cyanidin-based Anthocyanin Pigments. En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol. 50, (2002); p.6172.

Tabla 3. Sustituyentes de la estructura química de la antocianina.

Antocianina	Sustitución	
	R ₁	R ₂
Pelargonidina-3-glucósido	H	H
Cianidina-3-glucósido	OH	H
Delfinidina-3-glucósido	OH	OH
Peonidina-3-glucósido	OCH ₃	H
Petunindina-3-glucósido	OCH ₃	OH
Malvidina-3-glucósido	OCH ₃	OCH ₃

Figura 3. Estructura química de antocianina¹⁹.



2.3.2.2 Factores químicos que determinan el color y la estabilidad de las antocianinas.

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes artificiales, su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento²⁰. Factores como efectos estructurales, pH,

¹⁹ WROLSTAD, R, Op.cit. p.,23

²⁰DURST; R, WROLSTAD; RE Op.cit. p.,20.

temperatura, presencia de oxígeno y ácido ascórbico, concentración y actividad de agua de la matriz determinan la estabilidad del pigmento.

a) *Efectos estructurales:* Las características de absorción de soluciones de antocianinas son afectadas notablemente por la estructura del pigmento.

Giusti, estudió las características del color de diferentes antocianinas de pigmentos obtenidos de extractos de fresas y rábanos en solución metanólica a pH 1 y a temperatura ambiente. Encontró diferencias en la glicosidación y acilación de las antocianinas estudiadas, las cuales tienen un efecto evidente sobre las características espectrales y por ende del color de estos pigmentos. Fue manifestado un mayor efecto hipercrómico cuando se incrementa el número de unidades de azúcar en el pigmento, por ejemplo, la pelargonidina-3-soforósido-5-glucósido presentó una mayor absorptividad molar (ϵ) que su respectivo monoglucósido²¹.

b) *Efecto del pH:* El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas (Figura 4). La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula. En soluciones acuosas a valores de pH inferiores a dos, básicamente 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable o de ión oxonio o catión flavilio de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemiacetal y la forma chalcona, o de cadena abierta. Tanto el hemiacetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a 7 se presentan las formas quinoidales de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire.

c) *Efecto de la temperatura:* Incrementos de temperatura resultan en pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras²².

d) *Efecto del oxígeno y el ácido ascórbico.* El efecto degradativo del oxígeno y el ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas está relacionado. Sondheimer y Kertesz²³ reportaron que las condiciones que favorecen la oxidación aeróbica del ácido ascórbico en jugo de fresa y en sistemas modelo que contenían pelargonidina-3-glucósido proveniente de la fresa causaban grandes pérdidas de antocianinas, pero cuando el oxígeno era excluido del sistema no se observaba

²¹GIUSTI, M; RODRIGUEZ, L; WROLSTAD, R. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and no-acylated pelargonidin-based anthocyanins. En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol. 47, (1999); p. 4631-4637.

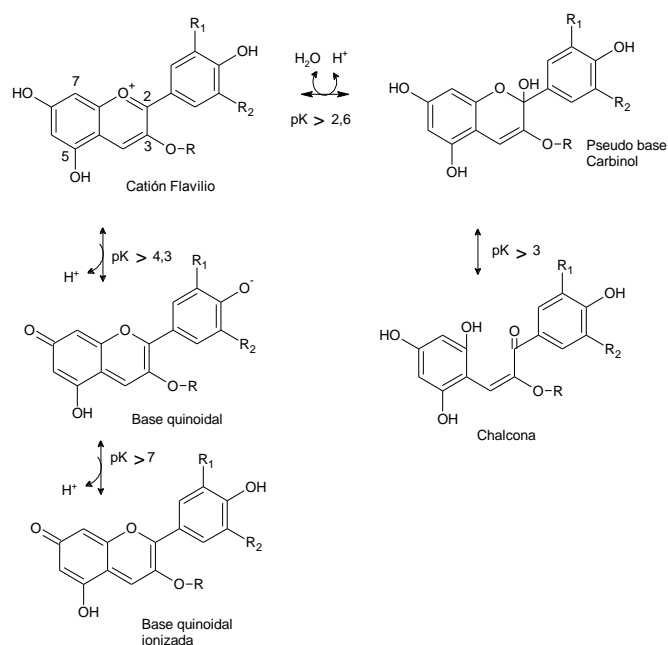
²²TIMBERLAKE, CF. Anthocyanins - Occurrence, extraction and chemistry. En: Journal Food Chemistry. Vol. 5, (1980); p. 69.

²³SONDHEIMER, E; KERTESZ, ZI. Participation of Ascorbic Acid in the Destruction of Anthocyanin in Strawberry Juice and Model Systems. En: Food Research. Vol. 18, (1953); p. 475.

deterioro del color. De igual manera, Markakis²⁴ reportaron un efecto sinérgico entre el ácido ascórbico y el oxígeno sobre la degradación de la pelargonidina-3-glucósido en solución. Garzón y Wrolstad²⁵, confirmaron la aceleración de la destrucción de antocianinas de fresa cuando el ácido ascórbico está presente tanto en sistemas naturales como en sistemas modelo.

e) *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 color²⁶. Algunas investigaciones sugieren que la copigmentación de las antocianinas con otros compuestos (copigmentos) es el principal mecanismo de la estabilización del color en las plantas²⁷.

Figura 4. Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH²⁸



Los copigmentos son sistemas ricos en electrones π que son capaces de asociarse con iones flavilio que son pobres en electrones. Esta asociación brinda

²⁴MARKAKIS, P; LIVINGSTON, G; FELLERS, R. Quantitative Aspects of Strawberry Pigment Degradation. En: Food Research. Vol. 22, (1957); p. 130.

²⁵ GARZÓN, GA; WROLSTAD, R. Comparison of the Stability of Pelargonidin-based Anthocyanins in Strawberry Juice and Concentrate. En: Journal Food Science. Vol. 67, (2002); p.1299.

²⁶ BOULTON, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. En: American Journal of Enology and Viticulture. Vol. 52, (2001); p. 67–87.

²⁷DAVIES, A; MAZZA, G. Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 41, (1993); p. 716–720.

²⁸ GIUSTI, M. Op.cit., p.26

protección para el ataque nucleofílico del agua en la posición 2 del ion flavilio²⁹ y de otras especies tales como peróxidos y dióxido de azufre en la posición 4³⁰. Los copigmentos son generalmente incoloros, pero cuando se mezclan con una solución antocianina, existe una interacción que produce un efecto hipercrómico y un desplazamiento batocrómico en los espectros de absorción (región UV-Vis).

Los copigmentos pueden ser flavonoides, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, polisacáridos, metales u otra antocianina.

La copigmentación puede, a su vez, subdividirse en tres categorías, según la naturaleza del copigmento implicado³¹

a) Copigmentación intermolecular: el copigmento es una molécula de naturaleza distinta al antociano monómero, como una molécula de flavonol, por ejemplo.

b) Copigmentación intramolecular: el copigmento es una porción de la propia molécula de antociano monómero, como puede ser el caso del sustituyente cumarilo de un antociano cumarílico.

c) Autoasociación: en este caso el copigmento es otra molécula de antociano monómero.

2.3.2.3 Métodos de extracción, separación y purificación de antocianinas

El proceso convencional de extracción radica en la maceración de la planta o fruto con pequeñas cantidades de ácido en metanol o etanol a temperatura ambiente ó en frío para evitar la degradación del pigmento. La adición de agua (10%-15%) en algunos casos permite una extracción completa dependiendo de la planta.

Para el posterior análisis se aplican técnicas de espectroscopía UV-Vis y cromatografía como lo es cromatografía en capa delgada (CCD) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), con el propósito de separar y detectar los pigmentos de interés y compuestos que son interferencia en el análisis.

Para la purificación de antocianinas la técnica más usada es la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de tipo analítica y preparativa, usada debido a la naturaleza no volátil, térmicamente lábil de las antocianinas y, porque permite

²⁹MATSUFUJI, H; OTSUKI, T; TAKEDA, T; CHINO, M; TAKEDA, M. Identification of reaction products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 51, (2003); p. 3157-3161.

³⁰GARCÍA, C; BRIDLE, P. Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid. En: Food Chemistry. Vol. 64, (1999); p. 21-26.

³¹GUTIÉRREZ I. Copigmentación y piranoantocianos: el papel de los flavonoles y los ácidos hidroxycinámicos en el color del vino tinto. En: Revista de enología. Vol. 1, No 81 (2007); p.79.

separar, identificar y cuantificar³². La mejor separación se logra usando HPLC en fase reversa, la cual permite realizar excelentes separaciones en tiempos cortos de análisis³³. Esto puede combinarse con un detector electroquímico (DE) o uno de arreglo de diodos (DAD), que proporciona alguna información básica sobre la naturaleza de la aglicona, el lugar de glicosidación de la antocianina y si se encuentra acilada.³⁴

2.3.2.4 Métodos de cuantificación.

El pH es uno de los principales factores del medio que afecta la estabilidad del color de las antocianinas, a diferentes valores de pH los espectros UV-Vis varían, por lo que esto ayuda a determinar si las antocianinas están o no polimerizadas. La concentración se determina con las absorbancias a diferentes pH's puesto que las antocianinas tienen dos bandas de absorción en la región UV (260-280 nm) y en la región visible (490-550 nm). Giusti y Wrolstad propusieron un método denominado método de pH diferencial que permite la estimación alternativa del contenido de antocianinas totales³⁵.

Para obtener la concentración de antocianinas totales se utilizan las siguientes fórmulas:

$$A = (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{\lambda_{700}})_{pH1} - (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{\lambda_{700}})_{pH4,5}$$

Donde: $A_{\lambda_{vis-max}}$ es la absorbancia en la longitud de onda máxima a pH 1 y pH 4,5 y $A_{\lambda_{700}}$ es la absorbancia a 700 nm a pH 1 y pH 4,5.

$$\text{Antocianinas monoméricas} \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{A \times Pm \times FD \times 1000}{\epsilon \times l}$$

Donde:

A = absorbancia calculada.

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

FD = factor de dilución.

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

l = espesor de la celda.

³² ESCRIBANO, M; SANTOS, C; JULIAN, C; RIVAS, G. Antocyanins in cereals. En: Journal of chromatography. Vol.1054, (2004); p.129-141.

³³ HYOUNG, S. Op.cit. p.,18.

³⁴ DA COSTA, C; HORTON, D; MARGOLIS, S. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. En: Journal of chromatography, Vol. 2 (2000); p. 403-410.

³⁵ GIUSTI, M; WROLSTAD, R. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. En: Current Protocols in Food Analytic Chemistry, (2001); F1.2.1-F1.2.9

Puesto que la muestra es desconocida se opta por utilizar el peso molecular y la absorbividad molar de la cianidina 3-glucósido. Los resultados se expresan en mg de cianidina 3-glucósido (Cy-3-glu) en 1 litro de extracto. Para el cálculo de la concentración final de antocianinas monoméricas (mg de Cy-3-glu/100 g de fruto) se utiliza el volumen del extracto y el peso de la muestra.

Método del pH sustractivo: El estudio del color polimérico se lleva a cabo mediante el uso de sistemas tampón, el empleo de un agente blanqueador (bisulfito de sodio) el cual tiene como función decolorar las antocianinas sin afectar los compuestos interferentes y la medición por espectroscopía UV-Visible. La densidad del color y el color polimérico son dos factores que permiten obtener el % de color polimérico a través de las siguientes ecuaciones:

La densidad de la muestra control, es decir sin tratar con bisulfito se obtiene así:

$$Densidad\ de\ color = [(A\lambda_{420} - A\lambda_{700}) + (A\lambda_{vis-max} - A\lambda_{700})] \times FD$$

El cálculo del color polimérico de la muestra blanqueada con bisulfito se realiza con:

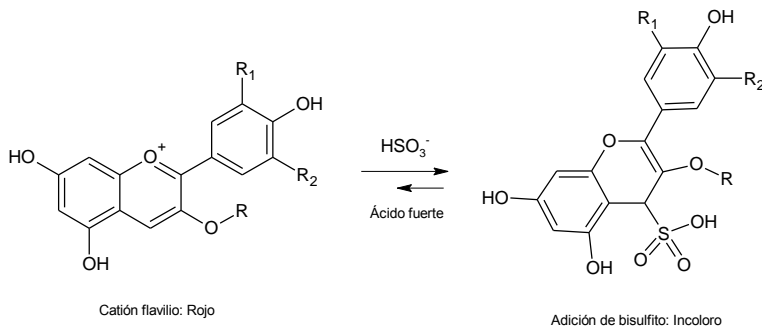
$$Color\ polimérico = [(A\lambda_{420} - A\lambda_{700}) + (A\lambda_{vis-max} - A\lambda_{700})] \times FD$$

Donde *FD* es el factor de dilución empleado.

Con los parámetros anteriores finalmente se obtiene el % de color polimérico de la siguiente manera:

$$\% \text{ Color polimérico} = \left(\frac{\text{Color polimérico}}{\text{Densidad de color}} \right) \times 100$$

Figura 5. Reacción de las antocianinas con bisulfito para formar antocianinas sulfónicas incoloras³⁶



³⁶ GIUSTI, M. Op.cit.,p.29.

2.3.2.5 Métodos de caracterización de antocianinas.

La espectroscopia UV-Vis es la técnica más usada para identificar y cuantificar antocianinas. Como se describió anteriormente, el espectro de absorción de las antocianinas depende del pH. La absorción máxima a 520-540 nm en la región visible es la longitud de onda más común usada en la medición espectrofotométrica de antocianinas³⁷.

La espectrometría de masas (EM) es una técnica aplicada comúnmente para la identificación de antocianinas determinando la masa de los iones moleculares en la muestra y los fragmentos de la separación de estos compuestos a través de la aplicación de energías ionizantes más altas³⁸. La resonancia magnética nuclear (RMN) ha ayudado a confirmar la estructura de la mayoría de antocianinas. Los experimentos de RMN ¹H dan información sobre la estructura base de la aglicona, del azúcar, su posición y sus posibles grupos acilo³⁹. Para complementar en su totalidad el estudio de la estructura química de la antocianina, se realizan experimentos complementarios en una dimensión como el ¹³C y en dos dimensiones como el COSY y el HMBC.

El uso de la espectroscopia RMN unidimensional y bidimensional con métodos de supresión de señal larga permite una identificación segura para las señales de resonancia de ¹H y ¹³C de antocianinas individuales en metanol deuterado (CD₃OD)⁴⁰. Con ayuda de estas técnicas se puede identificar la estructura química o realizar una aproximación⁴¹.

2.3.3 Capacidad antioxidante.

Las reacciones químicas de los radicales libres se dan constantemente en las células del cuerpo y son necesarias para la salud, pero el proceso debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante⁴². Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, liberando

³⁷ HORBOWICZ, M; KOSSON, R; GRZESIUK, A; DEBSKI, H. Anthocyanins of Fruits and Vegetables-their occurrence, analysis and role in human nutrition. En: Vegetables Crops Research Bulletin. Vol. 68 (2008); p. 5-22.

³⁸ ESCRIBANO, M. Op.cit. p.,24.

³⁹ KUSKOSKI, E; VEGA, J; RIO, J; FETT, R; TRONCOSO, A; ASUERO, A. Characterization of anthocyanins from the fruits of Baguacu (*Eugenia umbelliflora Berg*). En: International Journal of Sociology of Agriculture and Food. Vol. 51, (2003); p. 5450-5454.

⁴⁰ KOSIR, I. J; KIDRIC, J. Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds. En: Analytica Chimica Acta. Vol 458 (2002); p. 77-84.

⁴¹ JORDHEIM, M. Isolation, identification and properties of Pyranoanthocyanins and anthocyanin Forms. Bergen, 2007. Tesis postdoctoral. University of Noruega. Department of Chemistry, p. 85.

⁴² AVELLO, M; SUWALSKY, M. Radicales Libres, Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular. En: Revista Atenea-Universidad de Concepción. Vol 494 (II Sem. 2006); p. 161-172.

electrones en la sangre que son captados por los radicales libres, manteniendo su estabilidad⁴³.

La capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos a través de los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres⁴⁴. Estos mecanismos son adecuados a la muy corta vida media de los radicales libres y comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas con capacidad antioxidante. Los antioxidantes exógenos provienen de la dieta, y dentro de este grupo se incluyen la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides. La vitamina C constituye el antioxidante hidrosoluble más abundante en la sangre, mientras que la vitamina E es el antioxidante lipofílico mayoritario. En algunos alimentos existen otros antioxidantes no nutrientes llamados compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se sintetizan como metabolitos secundarios con funciones de defensa, y son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia, el sabor y el aroma de los vegetales. Se encuentran en las verduras y frutas, y en productos derivados como el vino o la cerveza. Todos tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con al menos un sustituyente hidroxilo⁴⁵. Su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno desde el grupo hidroxilo aromático puede ser donado a la especie radical, y a la estabilidad de la estructura quinona resultante que soporta un electrón desapareado⁴⁶.

2.3.3.1 Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante *in – vitro*

a) *Fenoles totales*. Para la determinación de fenoles totales se emplea el método espectrofotométrico desarrollado por Folin y Ciocalteu, este se fundamenta en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. Se utiliza como reactivo una mezcla de ácidos fosfotungstíco y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de fruta⁴⁷.

b) *Método TEAC (capacidad antioxidante equivalente a trolox)*. El radical ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) es generado tras una reacción que

⁴³ FINKEL, T; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. En: Nature 408, (2000); p. 23-247.

⁴⁴ GREENWALD, R. Current approaches to the development of oxygen radical scavenger. En: Drugs of Today. Vol. 26, (1990); p. 299-307.

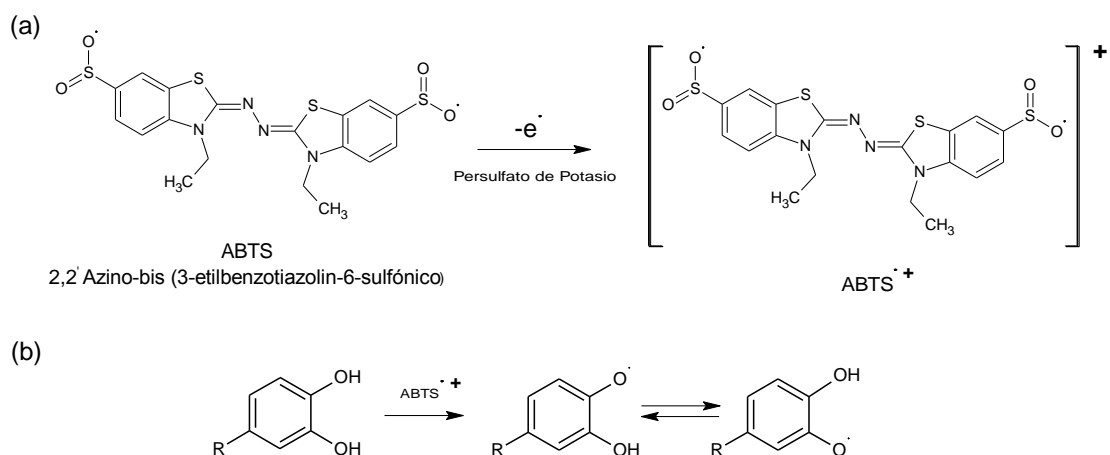
⁴⁵ BRAVO L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. En: Nutrition Review. Vol. 56 (1998); p. 317-333.

⁴⁶ PANNALA, AS; CHAN, TS; O'BRIEN, P; RICE-EVANS, C. Flavonoid Bring chemistry and antioxidant activity: fast-reaction kinetics. En: Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 282 (2001); p. 1161-1168.

⁴⁷ FOLIN, C.; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. En: Journal Biological Chemistry. Vol. 73, (1927); p. 627-650.

puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobulina) o electroquímica. Con este método, se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza tanto hidrofílica como lipofílica. El cromóforo ABTS presenta un color azul/verde con máximo de absorción a λ 342 nm, el cual es soluble tanto en agua como en disolventes orgánicos y químicamente estable. El radical $ABTS^{\cdot+}$ una vez generado por medio de enzimas o químicamente presenta nuevas características con máximos de absorción a λ (414, 645, 734 y 815 nm), pero se mide a una longitud de onda λ 734 nm. Una de las principales ventajas del uso de este radical es que tiene la capacidad de solubilizarse en medios acuosos y en medios orgánicos. El radical $ABTS^{\cdot+}$ es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de los antocianos, por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (λ 734nm) reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria⁴⁸.

Figura 6. (a) Formación del radical ABTS (b) Reacción del catión radical $ABTS^{\cdot+}$ con compuestos fenólicos⁴⁹.



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

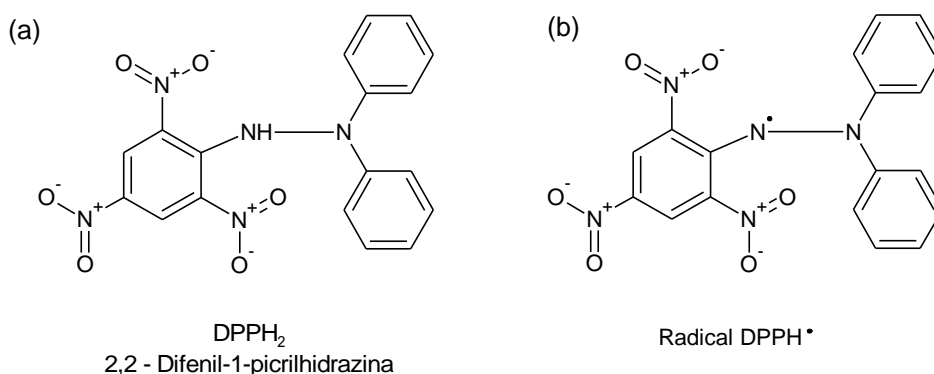
⁴⁸RE, R; PELLEGRINI, N; PROTEGGENTE, A; PANNALA, A; YANG, M; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine. Vol. 26 (1999); p. 1231-1237.

⁴⁹ Ibid., p. 33

capacidad antioxidante en equivalentes trolox ó TEAC (del inglés: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)⁵⁰.

c) *Método de eficiencia anti-radical*: El procedimiento desarrollado por Brand-Williams en 1995, utiliza como radical libre el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) de color violeta. Se fundamenta en la reducción del radical DPPH• por los antioxidantes de la muestra. El radical es estable y tiene una coloración violeta que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra que contiene sustancias antioxidantes (Figura 14a). La decoloración del radical se determina a una λ de 515 nm hasta alcanzar el equilibrio. Entre las ventajas de usar este método, se tiene que el ensayo DPPH es un método rápido y sencillo y que no requiere de un equipamiento sofisticado. La desventaja que tiene este método es que sólo puede disolverse en medio orgánico y en algunos casos la interpretación resulta complicada, ya que algunos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al DPPH⁵¹.

Figura 7. (a) DPPH₂. Molécula neutra, no radical de 2,2 – Difenil-1-picrilhidrazina. (b) Molécula radical DPPH•⁵²



Cuando el radical libre reacciona con el compuesto antioxidante (antocianina), este último le dona un protón y produce una decoloración que puede medirse a través del tiempo por medio de la absorbancia de la mezcla⁵³. La decoloración de la mezcla se debe a la aparición de la forma reducida del radical, cambiándolo así, de un color violeta a un amarillo con el transcurso del tiempo⁵⁴.

⁵⁰OKEZIE, I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. En: Mutation research. Vol. 523, (2002); p. 280.

⁵¹EINBOND, R.G; REYNERTSON, K.A; XIAO DONG, L; BASILE, MJ; KENNELLY, E.J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. En: Food Chemistry. Vol. 84, (2004); p. 23-28.

⁵² MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. En: Journal of science and technology, Vol. (2004); p. 211-219.

⁵³OKEZIE, I. Op.cit. p., 30.

⁵⁴ Ibid., p. 34

Con los datos de absorbancia y utilizando diferentes concentraciones de antioxidante, se puede calcular la concentración del radical en el medio de reacción y también el porcentaje de DPPH• remanente. Estos resultados y las diferentes concentraciones permiten encontrar el parámetro EC₅₀ el cual indica la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración de radical inicial a la mitad y el T EC₅₀, es decir el tiempo que tarda el EC₅₀ para alcanzar el estado estacionario incorpora el término eficiencia anti-radical el cual permite clasificar los antioxidantes y compararlos en términos de eficiencia anti-radical (EA)⁵⁵. El parámetro se calcula de la siguiente manera:

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

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

2.3.4 Aplicación de colorimetría triestímulo en antocianinas.

El color es una respuesta mental al estímulo producido en la retina por una radiación luminosa visible, pero la medida de este estímulo depende de las condiciones que lo rodean. Así, para lograr unificar dichas medidas se han definido unas condiciones estándar que permiten obtener resultados comparables, como son: el observador, el iluminante, la geometría de iluminación-observación y el intervalo de medida⁵⁶.

El estímulo cromático está caracterizado por la colorimetría triestímulo, la cual permite obtener una medida objetiva de color por medio de tres sensaciones o atributos psicométricos, que dan finalmente un carácter tridimensional a este estímulo. Estos son: el tono, la luminosidad y la saturación⁵⁷.

El tono o matiz, se refiere a aquella característica que permite clasificar un color como rojo, amarillo, verde o azul, y está relacionado con las diferencias de absorbancia/transmitancia de la energía radiante a diferentes longitudes de onda, en otras palabras es el atributo cualitativo del color.

La saturación o pureza, describe el grado o la intensidad con la que un color se separa del gris neutro y se acerca a un color puro del espectro, y describe la reflexión o transmisión a una determinada longitud de onda; es considerado el atributo cuantitativo de la cromaticidad.

⁵⁵ SÁNCHEZ, C; LARRAURI, J; SAURA, C. A procedure to measure the anti-radical efficiency of polyphenols. En: Journal of science of food and agriculture. Vol 76, (1998); p. 270- 276.

⁵⁶ CAMPOS, J; PONS, A; HEREDIA, F.J. Instrumental factors influencing absorption measurements for fluid food color determination. En: J. AOAC, Int. Vol 87 (2004); p. 632-638.

⁵⁷ HUTCHINGS, JB. Food Colour and Appearance. Blackie Academic & Professional, Glasgow, Estados Unidos, 1994.

La luminosidad o brillo, permite clasificar el color como claro u oscuro, que se define como la característica de una sensación de color que la hace equivalente a la producida por algún elemento de la escala de grises que va desde el blanco (máxima luminosidad - 100) hasta el negro (mínima luminosidad - 0), haciendo un elemento más claro u oscuro. Esta característica es una medida relativa de la luz reflejada frente a la absorbida, por lo tanto no se considera como partícipe de la cromaticidad⁵⁸.

2.3.5 Actividad biológica de las antocianinas

El interés en los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas⁵⁹ y ejercen efectos terapéuticos conocidos que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo. Los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante.

Estudios con fracciones de antocianinas provenientes del vino han demostrado que estas son efectivas en atrapar especies reactivas del oxígeno, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas⁶⁰.

A las antocianinas también se les atribuye actividad antitumoral y anticancerígena. Hagiwara⁶¹ demostró que el suministro de papas púrpuras dulces y repollo morado a ratas de laboratorio, causan supresión de tumores. Kamei y colaboradores⁶², reportaron la supresión de células cancerígenas HCT-15 provenientes del colon humano y de células cancerígenas gástricas AGS al suministrar fracciones de antocianinas del vino tinto. Así también, Tristan⁶³, realizó bioensayos que demuestran que los arándanos inhiben las etapas de iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis.

⁵⁸C.I.E. (1971). Colorimetry, (Official recommendations of the International Commission on Illumination) CIE Publicacion No. 15 (E-1.3.1).Tercera edición, Bureau Central de la CIE, Paris, actualización: CIE 15:2004.

⁵⁹ MIYAZAWA, T; NAKAGAWA, K; KUDO, M; MURASHI, K; SOMEYA K. Direct Intestinal Absorption of Red Fruit Anthocyanins, Cyanidin-3-Glucoside and Cyanidin-3,5-Diglucoside, Into Rats and Humans. En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol 47, (1999); p. 1083.

⁶⁰GHISELLI, A; NARDINI, M; BALDI, A; SCACCINI, C. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol 46, (1998), p. 361.

⁶¹ HAGIWARA, A; MIYASHITA, K; NAKANISHI, T; SANO, M; TAMANO, S. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1- methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. En: Journal Toxicology Science. Vol 171, No 1 (2001); p. 17-25.

⁶²KAMEI H, HASHIMOTO Y, KOIDE T, KOJIMA T, HASEGAWA M. Anti-Tumor Effect of Methanol Extracts from Red and White Wines. En: Cancer Biother Radiopharmaceuticals. 1998;13(6):447-52.

⁶³ TRISTAN, F; MOUL, D; ROGERS, RBD; RIBNICKY, DM; GIPP, WT. Phytochemical Composition and Metabolic Performance-Enhancing Activity of Dietary Berries. En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol 56, (2008); p. 654.

Referente a la actividad antiinflamatoria, Wang y Mazza⁶⁴, encontraron en extractos concentrados de antocianinas efecto inhibitorio de la producción de óxido nítrico en macrófagos activados. Por otra parte, Vuorela y colaboradores⁶⁵, encontraron efecto supresor de prostaglandina EG2, sinónimo de actividad antiinflamatoria en extractos de antocianinas de frambuesa.

De acuerdo a Tristan, antocianinas provenientes de cuatro especies de arándanos silvestres: *Amelanchier alnifolia*, *Viburnum trilobum*, *Prunus virginiana* y *Shepherdia argentea*, muestran propiedades hipoglicémicas. Tales frutos, con alto contenido de sustancias fitoquímicas, han sido consumidas tradicionalmente por tribus norteamericanas para la protección de enfermedades crónicas como diabetes.

Otro ejemplo de actividad antidiabética de las antocianinas fue reportado por Perossini⁶⁶. Estudios clínicos realizados en Italia revelaron que 79% de los pacientes diabéticos consumidores de extracto de bayas rojas (160 mg dos veces al día durante un mes) mostraron alivio en los síntomas de retinopatía diabética.

Finalmente, el mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo como resultado del consumo de antocianinas ha sido reportado por Ohgami⁶⁷, en este estudio suministraron extractos de frutas ricas en antocianinas a ratas con deficiencia ocular, lo cual resultó en un efecto antiinflamatorio y de aumento de la agudeza visual. Joseph⁶⁸ y Shukitt-Hale⁶⁹ han demostrado que el comportamiento cognitivo y las funciones neuronales de ratas de laboratorio puede ser mejorado a través de suplementación nutricional con extractos de arándanos y fresas.

⁶⁴ WANG, J; MAZZA, G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN γ - activated RAW 2647 macrophages. En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol 50, (2002); p. 850.

⁶⁵ VUORELA, S; KREANDER, K; KARONEN, M; NIEMINEN, R; HÄMÄLÄINEN, M; GALKIN, A. In vivo treatment of acute Chlamydia pneumoniae infection with the flavonoids quercetin and luteolin and an alkyl gallate, octylgallate, in a mouse model. En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol 53, (2005); p. 5922.

⁶⁶ PEROSSINI, M; GUIDI, G; CHIELLINI, S; SIRAVO, D. Studio Clinico Sull'impiego Degli Antocianisidi del Mirtillo (Tegens) nel Trattamento Delle Microangiopatie Retiniche di Tipo Diabetico ed Ipertensivo. En: Ottal Clinica Ocular. . 1987;113,1173-90

⁶⁷ OHGAMI, K; ILIEVA, I; SHIRATORI, K; KOYAMA, Y; JIN, XH; YOSHIDA, K. Anti-inflammatory Effects of Aronia Extract on Rat Endotoxin-Induced Uveitis. En: Investigative Ophthalmology & Visual Science. Vol 46, No 1 (2005); p. 275-281.

⁶⁸ JOSEPH, JA; SHUKITT-HALE, B; DENISOVA, NA; BIELINSKI, DB; MARTIN, A; MCEWEN, JJ; Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction cognitive and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. En: Journal Neuroscience. Vol. 19 (1999); p. 8114.

⁶⁹ SHUKITT-HALE, B; GALLI, RL; METERKO, V; CAREY, A; BIELINSKI, DF; MCGHIE, T, et al. Dietary Supplementation with Fruit Polyphenolics Ameliorates Age-related Deficits in Behavior and Neuronal Markers of Inflammation and Oxidative Stress. En: Springer review. Vol. 27 (2005); p. 49-57.

3. METODOLOGÍA

3.1 Equipos y reactivos. En esta sección se muestra la lista de equipos y reactivos empleados para ejecutar este trabajo de investigación.

3.1.1 Equipos.

Columna cromatográfica de 40 cm de largo por 3 cm de diámetro.

Columna cromatográfica Shimadzu C18 5 μm C18 110^a, 50 x 4.6 mm.

Espectrofotómetro UV-Vis Pharo Merck.

Espectrómetro de Masas Shimadzu LC 2010.

HPLC Waters 1525, con detector de arreglo de fotodiodos PDA Waters 2998.

Micropipetas 50 – 100 μm .

Rotaevaporador.

Vortex.

3.1.2 Reactivos.

Acetato de etilo, acetonitrilo, ácido ascórbico, ácido acético glacial, ácido clorhídrico, ácido fórmico, ácido gálico, ABTS, citrato de sodio, cloruro de potasio, carbonato de sodio, hexano, metabisulfito de sodio, metanol, reactivo de Folin, resina amberlita XAD-7, resina lipophilic sephadex LH-20.

La metodología que se utilizó para estudiar los pigmentos de la Mora, se llevó a cabo en tres etapas: primero la obtención del extracto de los pigmentos en el fruto de la mora, en seguida la purificación e identificación y posteriormente el estudio de actividad antioxidante de los extractos aislados.

Clasificación taxonómica: la identificación taxonómica de la planta se realizó en el Herbario de la Universidad de Nariño, esto con el fin de corroborar que es una especie de mora que aún no ha sido estudiada.

3.2 Muestreo: la recolección de la Mora se hizo en el municipio de San Lorenzo que se encuentra localizado en el Nor-Oriente del Departamento de Nariño y al Nor-Occidente de la ciudad de San Juan de Pasto a 2150 msnm. Se muestrearon frutos con un modelo aleatorio simple con estado 6 de maduración es decir frutos de color morado oscuro, los requisitos generales sobre las características del fruto van de acuerdo a la Norma Técnica Colombiana - 4106⁷¹. El índice de madurez se obtiene de la relación entre el valor mínimo de los sólidos solubles totales y el valor máximo de acidez titulable.

3.3 Obtención del extracto crudo: Los polifenoles se obtuvieron con una mezcla de Metanol: Ácido Acético⁷² en proporciones 19:1 a 5 °C aproximadamente, se realizó una filtración con el fin de eliminar residuos de partículas que pueden interferir en los procedimientos posteriores (semillas, hojas del fruto) y se cambió el solvente hasta la decoloración del fruto. Finalmente se recolectó todo el extracto.

3.4 Obtención del extracto rico en polifenoles: Inicialmente fue necesario eliminar del extracto los compuestos lipofílicos y medianamente polares, para ello se realizaron extracciones con n-hexano y acetato de etilo. Después de las extracciones, la fase acuosa se cargó en una columna cromatográfica de 40 x 2 cm empacada con una resina de amberlita XAD-7 (absorbente polimérico no iónico) activada con agua – HCl 0,01%. El extracto retenido se eluyó con una mezcla de metanol-ácido acético en proporciones 19:1 y después se eliminó el solvente mediante un rotaevaporador.

3.5 Separación de antocianinas monoméricas y poliméricas: Se utilizó una columna cromatográfica de 40 x 2 cm empacada con resina Lipophilic Sephadex LH-20 Sigma. La fracción de antocianinas monoméricas, mediante esta columna se logró separar las antocianinas monoméricas de las poliméricas. Las monoméricas se eluyeron utilizando una mezcla de metanol-agua 1:4 con ácido

⁷¹ NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 4106 FRUTAS FRESCAS. MORA DE CASTILLA. ESPECIFICACIONES.

⁷²JORDHEIM, M. Isolation, identification and properties of pyranoanthocyanins and anthocyanin forms. Bergen, 2007. Tesis (posdoctorado). University of Bergen. Department of Chemistry. p. 82.

fórmico 0,1%. Las antocianinas poliméricas se eluyeron con una mezcla de acetona-agua 2:1 con ácido fórmico 0,1 %.⁷³

3.6 Análisis de antocianinas por HPLC-analítica: El extracto de mora rico en polifenoles y las fracciones separadas por Sephadex, se analizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia en modo analítico en un equipo Waters con detector de arreglo de fotodiodos y equipado con una columna X-terra C-18 (100 mm x 4,6 mm y 3,5 μ m). Para el análisis fue necesario utilizar dos fases móviles compuestas de agua, acetonitrilo y ácido fórmico. Las proporciones de la fase móvil A fueron 87:3:10 y 40:50:10 para la fase móvil B, estos fueron previamente filtrados y desgasificados. La muestra se disolvió en 10 mL de la fase móvil A y posteriormente se filtró en un cartucho de 0,45 μ m de diámetro de poro. Para el análisis HPLC se utilizó el siguiente gradiente: 0-6% de B (0-10 minutos); 6-20% de B (10-20 minutos); 20-40% de B (20-30 minutos); 40- 50% de B (30-35 minutos) y 50-6% de B (35-40 minutos), con un flujo de 0,8 mL/min⁷⁴

Figura 8. Cromatógrafo –HPLC Waters 1525⁷⁵



3.7 Determinación de fenoles totales: Para la determinación de fenoles totales se utilizó el método de Folin y Ciocalteau, en este procedimiento se emplean 0,1 mL de la solución a analizar, 0,5 mL del reactivo de Folin Ciocalteau y 1,5 mL de una solución acuosa de carbonato de sodio Na_2CO_3 al 20 % p/v; aforando a 10 mL con agua destilada. Se dejó pasar 2 horas aproximadamente y se tomó lectura de la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. Se realizó también una curva de calibración de ácido gálico con soluciones de 50, 100,150, 250 y 500 ppm, para expresar los resultados en mg de ácido gálico/ 100 g de peso fresco⁷⁶.

⁷³ JIMÉNEZ, J; VILLARREAL, J. Estudio químico de pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del Motilón (*Hyeronima macrocarpa*). San Juan de Pasto, 2008, 104h. Trabajo de grado (Químico). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química.

⁷⁴ JIMÉNEZ, J; VILLARREAL, J.Op.cit. p., 37.

⁷⁵ FUENTE: Esta investigación.

⁷⁶ KUSKOSKI, E; Op.cit. p., 27.

3.8 Identificación de antocianinas mayoritarias: el extracto rico en polifenoles y las fracciones ricas en antocianinas monoméricas separadas por Sephadex, se analizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).

3.8.1 Determinación de antocianinas monoméricas totales: el contenido de antocianinas monoméricas en los extractos se determinó por espectroscopia UV-Vis mediante el método del pH diferencial⁷⁷. Se utilizaron soluciones tampón de ácido clorhídrico /cloruro de potasio 0,025 M pH 1 y ácido acético /acetato de sodio 0,4 M pH 4,5.

3.8.2 Determinación de antocianinas poliméricas: el contenido de antocianinas poliméricas en los extractos se determinó con el método del pH sustractivo⁷². Se prepararon soluciones de los extractos utilizando como solvente un tampón de ácido clorhídrico /cloruro de potasio 0,025 M pH 1. Se transfirieron 2,8 mL de muestra diluida en 2 tubos de ensayo. Al primer tubo se adicionó 0,2 mL de metabisulfito de sodio al 40% en agua y al segundo tubo se agregó 0,2 mL de agua destilada. Transcurridos 15 minutos se midieron absorbancias a 420 nm, a la longitud de onda de máxima absorbancia y a 700 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Pharo Merck, se utilizó como blanco agua destilada.

3.9 Determinación de la capacidad antioxidante:

3.9.1 Método de la capacidad antioxidante equivalente a trolox (TEAC)⁷⁸. Con este método se estudió la actividad antioxidante de soluciones p/v del extracto crudo, del rico en polifenoles y de las fracciones purificadas por HPLC semi-preparativa.

Para la implementación del método se realizaron las siguientes etapas:

a) Formación del catión radical ABTS^{•+}. Se preparó una solución stock disolviendo 193 mg de ABTS y 33 mg de persulfato potásico en agua desionizada. Esta solución se dejó en reposo durante 24 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente con el radical formado se procedió a realizar una solución de trabajo diluyendo con metanol HPLC hasta llegar a un valor de absorbancia cercano a 1 a una longitud de onda de máxima absorción de 734 nm.

b) Elaboración de la recta de calibrado con patrones de trolox. Se prepararon soluciones de trolox a las siguientes concentraciones: 0,4; 0,8; 1,2; 1,6 y 2 mM.

c) Medición de la capacidad antioxidante. Se adicionaron 30 µL de la solución a estudiar a 3 mL de la solución de trabajo, se agitó con vortex durante 1 minuto y

⁷⁷ GIUSTI, M; WROLSTAD, R. Op.cit. p.,25.

⁷⁸ RE, R; PELLEGRINI, N. Op.cit p.,29.

después de 6 minutos de reposo, se midió la absorbancia a 734 nm en el espectrofotómetro UV-Vis Pharo Merck.

Con los patrones de trolox se realizó la misma metodología. La funcionalidad del método se comprobó con un patrón de ácido ascórbico y los resultados se expresaron como μmol de trolox/g de fruta. El método se desarrolló por triplicado.

3.9.2 Método DPPH [2,2-difenil-1-picrilhidrazilo]: con este método se estudió la eficiencia anti-radical de las soluciones⁷⁹.

Para realizar este análisis se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Pharo, tomando medidas de absorbancia a 515 nm. Inicialmente fue necesario construir una recta de calibrado, para ello se preparó una solución 0,05 mM de DPPH y a partir de esta se hacen diluciones a 0,0026 mM; 0,0054 mM; 0,0083 mM; 0,014 mM y 0,025 mM, para realizar una curva de calibración de absorbancia contra concentración de DPPH' a una longitud de onda de 515 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Pharo. Para medir la eficiencia antiradical de los extractos de interés se tomaron 3,9 mL de solución de DPPH' 0,05 mM y se mide su absorbancia a 515 nm. Posteriormente se adiciona 0,1 mL de la solución a analizar y se registra la disminución de absorbancia hasta la estabilización de la solución. Los tiempos finales de reacción están sujetos a la naturaleza de las muestras. La funcionalidad del método se verificó con patrones de ácido ascórbico.

3.9.3 Estabilidad del color. La estabilidad del color del extracto crudo con respecto al pH se midió utilizando una solución del mismo con HCl al 1%. Los cambios de pH se llevaron a cabo mediante el uso de una solución de hidróxido de sodio 10 M, la cual se adicionó gota a gota (por lo que se considera despreciable el cambio de volumen), se hicieron las diferentes mediciones de pH y se tomaron los espectros en la región visible.

⁷⁹EINBOND, R.G; REYNERTSON, K.A. Op.cit p.,30

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Clasificación y características de la planta.

De acuerdo a los análisis desarrollados por el herbario de la Universidad de Nariño a un ejemplar de Mora, recolectado en San Lorenzo, la planta fue clasificada como *Rubus urticaefolius* poir R.

Figura 9. Planta de Mora *Rubus urticaefolius* poir R⁸⁰.



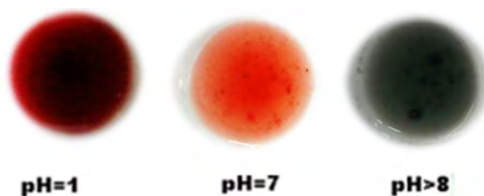
4.1.1 Preparación de la muestra: se recolectó 1 kg de Mora, con el que se realizó una separación manual que consistió en escoger los frutos que tenían coloración morado oscuro. De acuerdo a la NORMA TÉCNICA COLOMBIANA **NTC 4106** para frutas frescas, se determinó el índice de madurez dando como resultado 3,04 °Brix/%Ácido Málico, este parámetro permitió designar un estado de maduración 6, lo cual corrobora de mejor manera que la elección del fruto fue adecuada. Se trabajó entonces con 690,63 g de fruta fresca.

4.2 Ensayos preliminares.

De acuerdo a estudios anteriores en mora (de diferente especie), los pigmentos que ocasionan la coloración del fruto son las antocianinas. Como bien se sabe este tipo de pigmentos presentan una variación del color cuando existen cambios de pH por lo que este fue un punto clave para determinar la presencia de antocianinas. En la figura se puede apreciar los cambios de color.

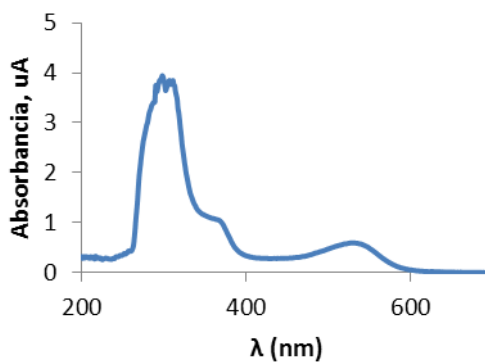
⁸⁰ FUENTE: Esta Investigación.

Figura 10. Variación del color del extracto de Mora con respecto al pH⁸¹.



Para mayor confiabilidad se procedió a medir un espectro UV-Vis al extracto crudo en metanol acidificado. El perfil observado en la figura 11 muestra dos señales características, la primera a 290 nm en la región UV y la segunda a 527 nm en la región visible, lo cual confirma la presencia de antocianinas en el fruto de la mora.

Figura 11. Espectro UV-Vis del extracto de Mora⁸².



4.3 Tratamiento de la muestra.

En el apartado 3.3 se describe el procedimiento para la maceración química del fruto de la mora.

Figura 12. Maceración química del fruto⁸³.



⁸¹ FUENTE: Esta Investigación.

⁸² FUENTE: Esta Investigación.

⁸³ FUENTE: Esta Investigación.

Después de realizar la maceración, al filtrar se obtuvo un sobrenadante de un color rojo intenso, este extracto en adelante se denominará extracto crudo de *Rubus* (ECR). Posteriormente este extracto se cargo sobre la columna de Amberlita (figura 13) con el fin de eliminar azúcares y sales, consiguiendo así un extracto rico en polifenoles (EPR). Después de este procedimiento se obtuvieron 12,690 g gramos de extracto crudo y 5,07 gramos de extracto retenido en la resina, a partir de 690,63 gramos de fruta.

Figura 13. Columna cromatográfica cargada con resina XAD-7. (b) Concentración del extracto rico en polifenoles.

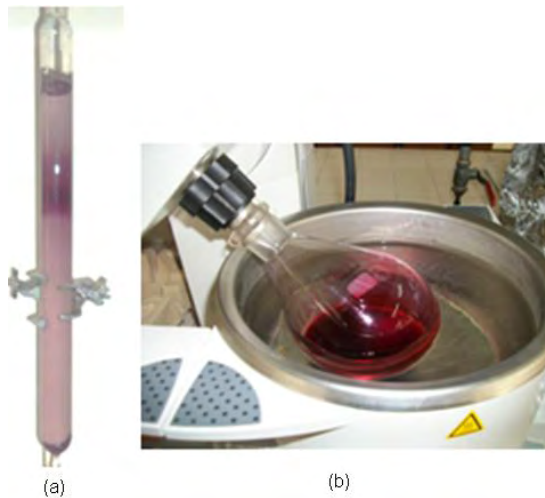
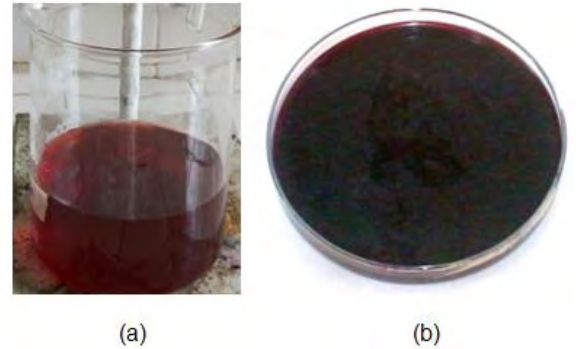


Figura 14. (a) Extracto ECR (b) Extracto EPR.



4.4 Cuantificación.

4.4.1 Determinación de antocianinas monoméricas totales.

Este procedimiento se realizó mediante el método de pH diferencial, el cual se basa en la reacción que las antocianinas experimentan por el cambio de pH, esto se evidencia en la variación de la absorbancia. En la tabla a continuación se muestra el contenido de antocianinas monoméricas totales.

⁸⁴ FUENTE: Esta Investigación.

Tabla 4. Contenido de antocianinas monoméricas.

RÉPLICA	EXTRACTO ECR ^a	EXTRACTO EPR ^a
1	34,30	43,50
2	32,10	41,30
3	31,00	39,50
Promedio	32,46	41,43
Desv. Est	1,68	2,00
CV	0,052	0,048

^a mg de Cy-3-glu/100g de fruto.

Teniendo en cuenta los resultados se puede observar que existe un alto contenido de antocianinas monoméricas en los extractos, pero el extracto purificado a través de la resina XAD-7 evidencia un contenido mayor que el extracto crudo, este resultado era de esperarse puesto que el extracto al purificarse está libre de azúcares, ácidos orgánicos y compuestos lipofílicos.

En la siguiente tabla se muestra el contenido total de antocianinas monoméricas de diferentes clases de mora y frutos:

Tabla 5. Contenido total de antocianinas en variedad de frutos.

FRUTOS	CONTENIDO TOTAL DE ANTOCIANINAS ^a
<i>Rubus adenotrichus Schlttdl.</i>	77 ± 0,11 ⁸⁵
<i>Rubus glaucus Benth</i>	45 ± 7,07 ⁸⁶
<i>Morus nigra</i>	41,8 ± 1,8 ⁸⁷
Uva	30,9 ± 0,1 ⁸⁸
fresa	23,7 ± 1,8 ⁸⁹
AÇai	22,8 ± 0,8 ⁹⁰

^a mg de Cy-3-glu/100g de fruto.

⁸⁵VAILLANT, F. Op.cit. p.,15

⁸⁶GARZÓN, GA; RIEDL, KM; SCHWARTZE, SJ.Determination of AnthocyaninsTotal Phenolic Content, and Antioxidant Activity in Andes Berry (*Rubus glaucus Benth*). En: Journal Food Chemistry. Vol. 74, No 3 (2009); p. 227-232.

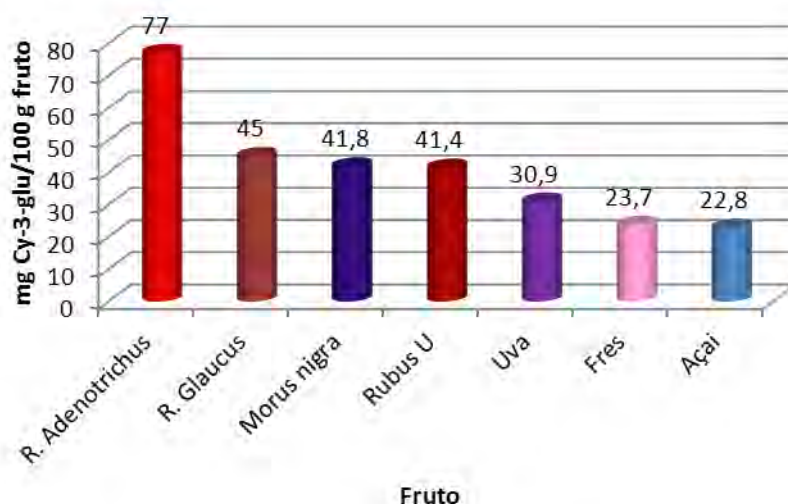
⁸⁷KUSKOSKI, M. Op.cit. p.,27

⁸⁸Ibíd., p. 27

⁸⁹Ibíd., p. 27

⁹⁰Ibíd., p. 27

Gráfica 1. Comparación del contenido total de antocianinas en variedad de frutos.



4.4.2 *Determinación de antocianinas poliméricas:* mediante el método del pH sustractivo se estableció el contenido de antocianinas poliméricas. Las antocianinas monoméricas al reaccionar con bisulfito de sodio forman un compuesto incoloro en cambio las antocianinas poliméricas presentan resistencia a la decoloración, por lo que las absorbancias a la longitud de onda máxima y a 420 nm corresponden exclusivamente a las antocianinas poliméricas.

Tabla 6. Contenido de antocianinas poliméricas para el extracto crudo y para el purificado.

RÉPLICA	DENSIDAD DE COLOR		COLOR POLIMÉRICO		% COLOR POLIMÉRICO	
	ECR	EPR	ECR	EPR	ECR	EPR
1	0,866	0,242	0,117	0,056	13,510	23,14
2	0,872	0,237	0,114	0,058	13,073	24,473
3	0,871	0,242	0,115	0,057	13,203	23,75
Promedio	0,869	0,240	0,115	0,057	13,262	23,787
Desv. Est.	0,003	0,002	0,001	0,001	0,224	0,667
CV	0,035	0,008	0,009	0,018	0,017	0,028

El contenido de antocianinas poliméricas para el ECR y para el EPR expresado en porcentaje de color polimérico corresponde a 13,262 % ($\pm 0,224$) y 23,787($\pm 0,667$) respectivamente. Se puede evidenciar un aumento del valor en el extracto purificado debido a que después de este procedimiento aumenta la concentración de antocianinas poliméricas lo que se refleja en la estabilidad del color del

extracto, de acuerdo a la literatura las antocianinas poliméricas ante los cambios de pH no muestran un cambio relevante de color reversible como lo presentan las antocianinas monoméricas.

4.4.3 Determinación de fenoles totales: el contenido fenólico para los extractos crudo y purificado se determinó por el método de Folin-Ciocalteu, los compuestos fenólicos se oxidan por el reactivo Folin-Ciocalteu de coloración amarilla, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3HW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), estos al reducirse por acción de los compuestos fenólicos dan origen a una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}) los cuales exhiben una amplia absorción de luz, con un máximo a 765nm. La intensidad de la absorción de luz a esa longitud de onda, es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos.⁹¹

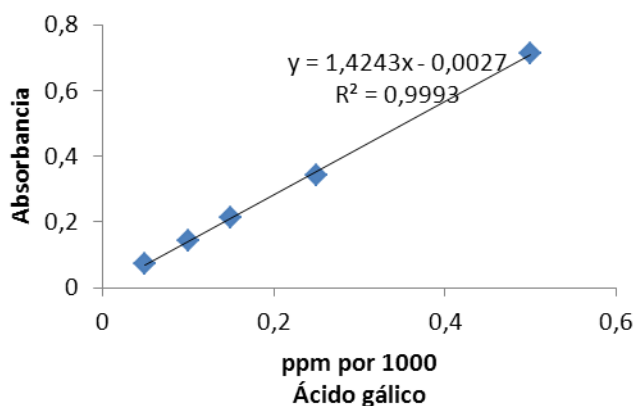
La tabla 7 indica los resultados que se obtuvieron por triplicado de la prueba de Folin – Ciocalteu en 5 patrones de ácido gálico empleados para realizar la recta de calibrado.

Tabla 7. Datos curva de calibración.

CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO ^a	ABSORBANCIA ^b
50	0,072 ± 0,008
100	0,142 ± 0,003
150	0,212 ± 0,003
250	0,342 ± 0,042
500	0,714 ± 0,070

^appm, ^b DS de tres réplicas

Gráfica 2. Recta de calibrado de ácido gálico⁹².



⁹¹ ARAVENA, S; ORTHOFER, VL; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. En: *Meth. Enzymol.* Vol. 299 (1999); p. 152–178.

⁹² FUENTE: Esta Investigación.

El contenido total de fenoles para el ECR y para EPR se obtuvo con la ecuación de la recta. El coeficiente de correlación cercano a uno indica una buena linealidad de la gráfica. Los valores encontrados se expresan como miligramos de ácido gálico por gramo de fruta. Para el ECR fue de $164,34 \pm 0,735$ y para el EPR fue de $298,33 \pm 0,288$. Este incremento se debe probablemente al enriquecimiento de antocianinas proporcionado por la purificación del extracto mediante cromatografía en columna (Amberlita XAD-7).

Tabla 8. Fenoles totales para los ECR y EPR⁹³.

EXTRACTO	RÉPLICA	FENOLES TOTALES ^a
ECR	1	164,34
	2	165,07
	3	163,61
	Promedio	164,34
	Desv. Est	0,735
	CV	0,004
EPR	1	298
	2	298,5
	3	298,5
	Promedio	298,33
	Desv. Est	0,288
	CV	$9,6 \times 10^{-4}$

^amg de Ácido gálico/100 g fruta.

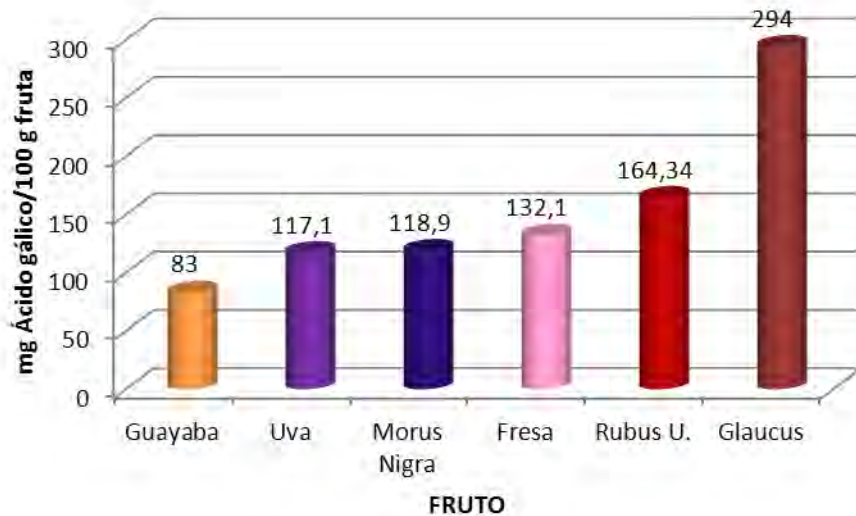
Realizando una comparación del contenido fenólico total presente en el fruto de la mora investigada (164,34 mg/100 g de fruta) con respecto a la mora de castilla, *Rubus glaucus* (294 mg/100 g de fruta) se observa que la mora en estudio contiene menor cantidad de fenoles totales.

Sin embargo de acuerdo a la literatura⁹⁴ *Morus nigra* evidencia un contenido de fenoles totales igual a 118 mg/100g de fruta. Otros frutos como la fresa (132,1 mg/100 g de fruta), la uva (117,1 mg/100 g de fruta) y la guayaba (83 mg/100 g de fruta), tienen un contenido fenólico total mas bajo que el extracto de la mora *Rubus urticaefolius*. Concluyendo así que la mora en estudio tiene un mayor contenido de fenoles totales que las frutas mencionadas anteriormente.

⁹³ FUENTE: Esta Investigación.

⁹⁴KUSKOSKI, M; ASUERO, A. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. En: Ciencia y Tecnología de alimentos. Vol. 25 (2005); 726-732.

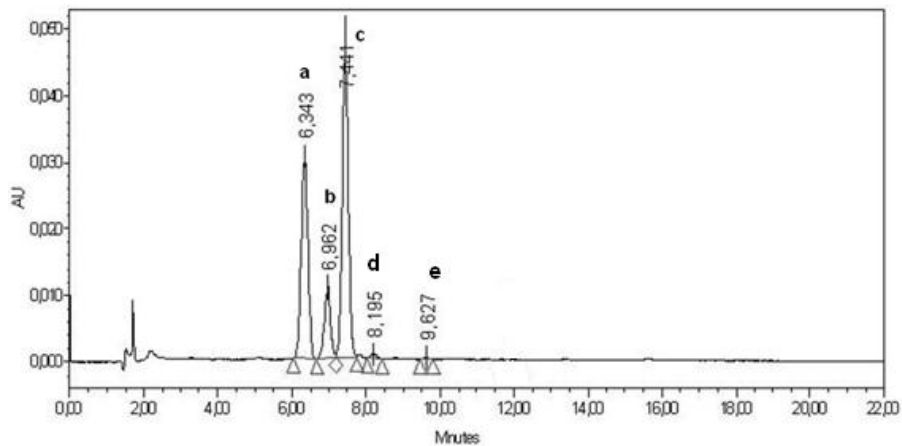
Gráfica 3. Comparación del contenido de fenoles totales en diferentes frutos.



4.5 Purificación de antocianinas.

El extracto rico en polifenoles (EPR) fue analizado por HPLC-PDA, con las condiciones mencionadas en el apartado 3.6. En el cromatograma de este extracto medido a 520 nm se observan tres picos mayoritarios (a, b, c). Los tiempos de retención y su área respectiva se observan en la tabla 9.

Figura 15. Perfil cromatográfico de la fracción purificada por resina XAD-7 con máximo de absorción a 520 nm⁹⁵.



⁹⁵ FUENTE: Esta Investigación.

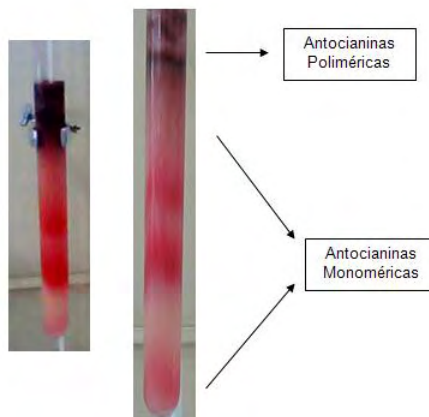
Tabla 9. Tiempos de retención y porcentaje de área de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto purificado (EPR)⁹⁶

SEÑAL	TR EXPERIMENTAL (min)	% ÁREA
a	6,343	32,89
b	6,962	12,73
c	7,441	53,54
d	8,195	0,52
e	9,627	0,32

Con el propósito de facilitar la purificación de los pigmentos individuales por HPLC semi-preparativa, mediante el procedimiento descrito anteriormente (apartado 3.5) se aislaron de este extracto las antocianinas monoméricas de las poliméricas.

Como se observa en la figura 16 se lograron obtener tres fracciones monoméricas de coloración rosada y una fracción de color vinotinto que corresponde a las antocianinas poliméricas, posteriormente estos extractos se analizaron por HPLC tipo analítico. Al comparar el perfil cromatográfico de la fracción purificada por resina XAD-7 con los perfiles de cada una de las fracciones monoméricas se puede evidenciar una vez más la presencia de tres componentes mayoritarios. Se concluye que la purificación por cromatografía de exclusión por tamaño fue exitosa.

Figura 16. Separación de antocianinas monoméricas y poliméricas⁹⁷.



⁹⁶ FUENTE: Esta Investigación.

⁹⁷ FUENTE: Esta Investigación.

A continuación se presentan los perfiles cromatográficos de las diferentes fracciones con sus respectivos tiempos de retención.

Figura 17. (a) Perfil cromatográfico de la primera fracción monomérica purificada por sephadex con máximo de absorción a 520 nm⁹⁸.

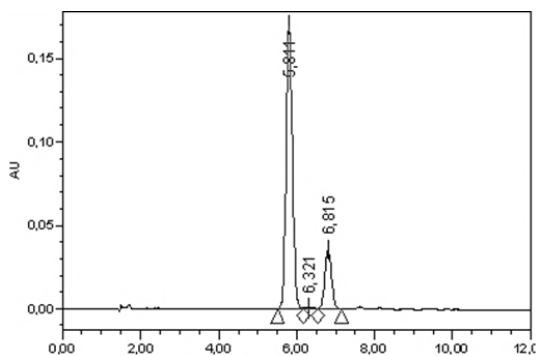
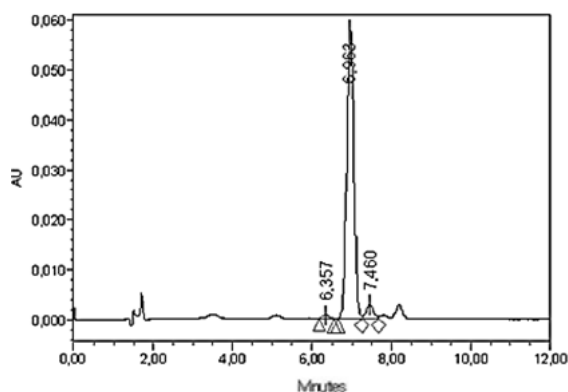


Tabla 10. Tiempos de retención y porcentaje de área de los compuestos mayoritarios presentes en la primera fracción obtenida por sephadex.

SEÑAL	TR EXPERIMENTAL (min)	% ÁREA
a	5,811	81,34
b	6,321	0,54
c	6,815	18,12

Figura 18. (a) Perfil cromatográfico de la segunda fracción monomérica separada por sephadex con máximo de absorción a 520 nm⁹⁹.



⁹⁸ FUENTE: Esta Investigación.

⁹⁹ FUENTE: Esta Investigación.

Tabla 11. Tiempos de retención y porcentaje de área de los compuestos mayoritarios presentes en la segunda fracción obtenida por sephadex.

SEÑAL	TR EXPERIMENTAL (min)	% ÁREA
a	6,357	0,97
b	6,963	94,36
c	7,460	4,67

Figura 19. (a) Perfil cromatográfico de la tercera fracción monomérica separada por sephadex con máximo de absorción a 520 nm¹⁰⁰.

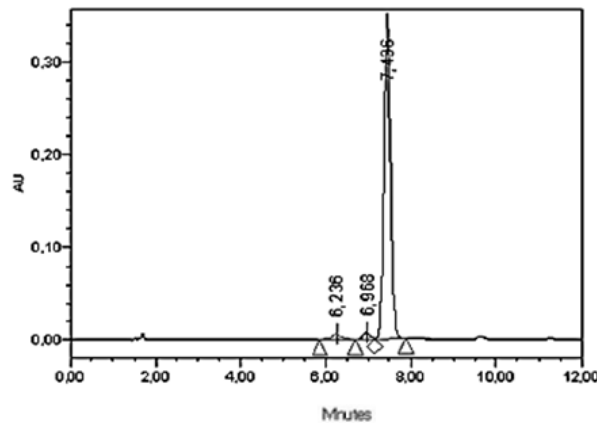


Tabla 12. Tiempos de retención y porcentaje de área de los compuestos mayoritarios presentes en la tercera fracción obtenida por sephadex.

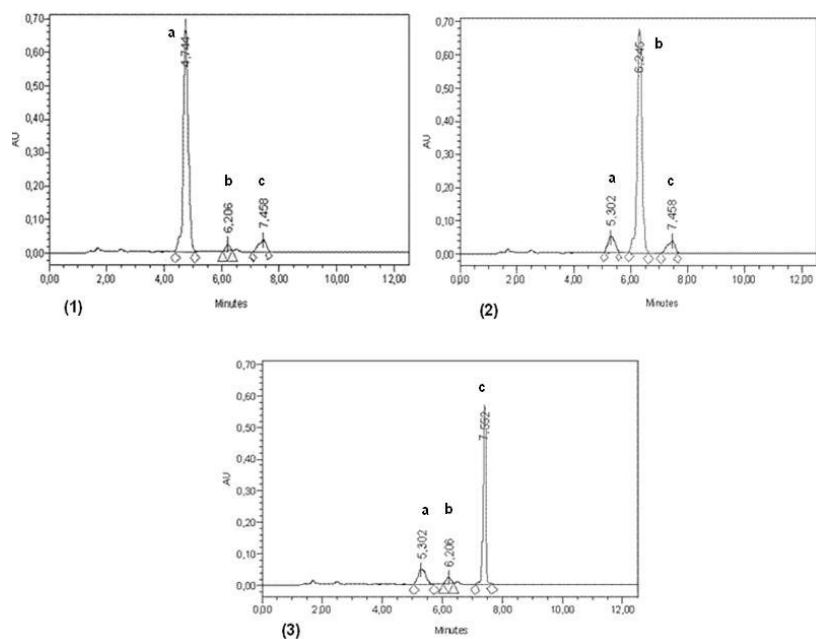
SEÑAL	TR EXPERIMENTAL (min)	% ÁREA
1	6,236	2,55
2	6,968	2,24
3	7,436	95,21

Para la obtención de los compuestos con una pureza significativa, cada fracción obtenida por cromatografía de exclusión por tamaño (sephadex), se purificó mediante cromatografía líquida en modo semi-preparativa. Al equipo utilizado para HPLC-análítico fue necesario acoplar una columna Geminix C-18 (250 mm x 10 mm y 3,5 μ m). La condición más adecuada que se encontró después de diferentes ensayos fue un sistema de solventes en proporción 50% de A (agua / acetonitrilo /

¹⁰⁰ FUENTE: Esta Investigación..

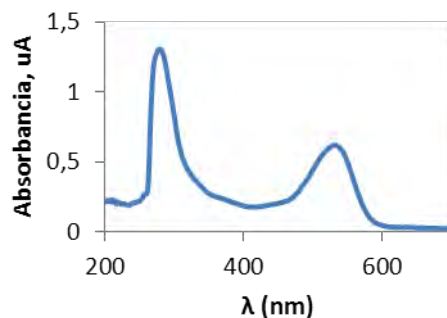
ácido fórmico 87:3:10) y 50% de B (agua / acetonitrilo / ácido fórmico 40:50:10) en modo isocrático.

Figura 20. Perfiles cromatográficos de los componentes mayoritarios purificados¹⁰¹.



Se estudió el perfil del espectro UV-Vis de las fracciones purificadas por HPLC semi-preparativa, para lo que fue necesario disolver cada una de ellas en metanol acidificado (pH 1,067). Los espectros con sus longitudes de onda de máxima absorción en el visible, se muestran en las figuras 21 a 23.

Figura 21. Espectro UV -Vis de la **Antocianina a** purificada por HPLC-PDA¹⁰².



¹⁰¹ FUENTE: Esta Investigación.

¹⁰² FUENTE: Esta Investigación.

Figura 22. Espectro UV-Vis de la **Antocianina b** purificada por HPLC-PDA¹⁰³.

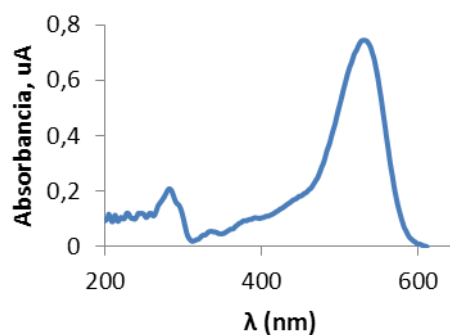
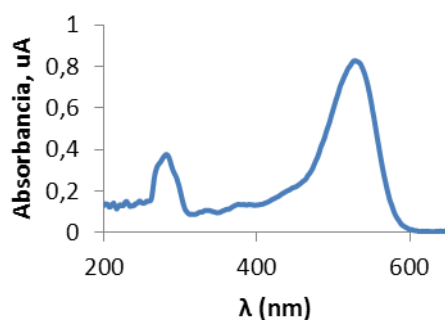


Figura 23. Espectro UV-Vis de la **Antocianina c** purificada por HPLC-PDA¹⁰⁴.



Con la información espectral anterior fue posible determinar mediante relaciones de absorbancia algunas características estructurales de cada uno de los compuestos purificados. Para observar donde existen sustituciones glicosídicas en la molécula se emplea la relación¹⁰⁵ $A_{440}/A_{\lambda_{vis-max}}$, y para las acilaciones la relación es la siguiente: $A_{acil}/A_{\lambda_{vis-max}}$

Tabla 13. Parámetros espectroscópicos de las antocianinas puras¹⁰⁷

ANTOCIANINA	$A_{440}/A_{\lambda_{vis-max}}$	$A_{acil}/A_{\lambda_{vis-max}}$
a	0,312	0,7
b	0,310	0,1
c	0,325	0,22

¹⁰³ FUENTE: Esta Investigación.

¹⁰⁴ FUENTE: Esta Investigación.

¹⁰⁵ GIUSTI, M; WROLSTAD, R. Op.cit. p.,25.

¹⁰⁷ FUENTE: Esta Investigación.

Para las tres antocianinas la relación $A_{440}/A_{\lambda_{vis-max}}$ tiene valores superiores a 0,3, lo que indica que las agliconas están sustituidas en la posición 3. En la determinación de la presencia de acilaciones se debe tener en cuenta que estas se observan a partir de una tercera banda de absorción en la región de 310 a 360 nm, si la relación es menor a 0,4 no hay acilaciones, como es en el caso de las antocianinas b y c, pero para la antocianina **a**, si se evidencia la acilación.

4.6 Caracterización por cromatografía de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).

Las muestras se solubilizaron en metanol, se filtraron y se inyectaron 5 μ L de la solución a una columna Shimadzu C18 5 μ m C18 110A, 50 x 4,6 mm con fase móvil ACN: H₂O: HCOOH. La interfase utilizada para el acople con el espectrómetro de masas fue ESI, ionización positiva y negativa, analizador cuadrupolo, equipo LC 2010 marca Shimadzu.

Las condiciones del análisis fueron:

Fase móvil: A: Agua al 1 % en ácido fórmico B: ACN al 1 % en ácido fórmico.
Gradiente: 6-20 % B 0-10 min., 20-40 % B 10-20 min., 40-50 % B 20-30 min., 50-6 % B 30-35 min.

Flujo 0,5 mL / min.

Voltaje del detector: 1.5 KV

CDL: 250 °C

Heat Block: 250°C

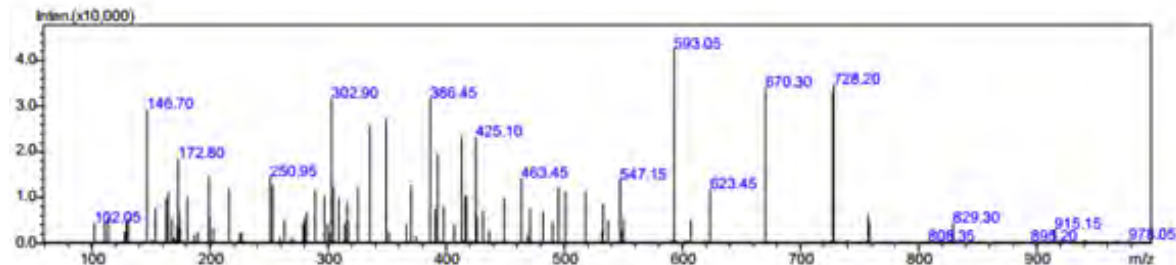
Gas nebulizador: 1.0 L / min.

Con el fin de profundizar en la identificación de cada uno de los pigmentos mayoritarios en el fruto de la mora se registraron los espectros de masas de las señales **a**, **b** y **c** observadas en el cromatograma de la figura 15.

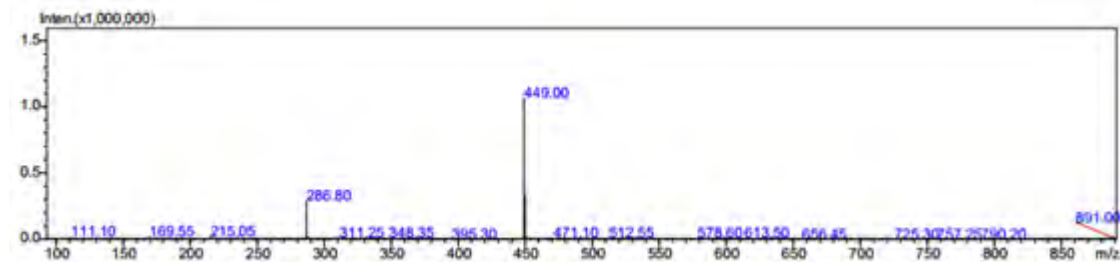
Figura 24. Espectros de masas de las señales a, b y c¹⁰⁸.

Espectro de masas ESI del **compuesto**

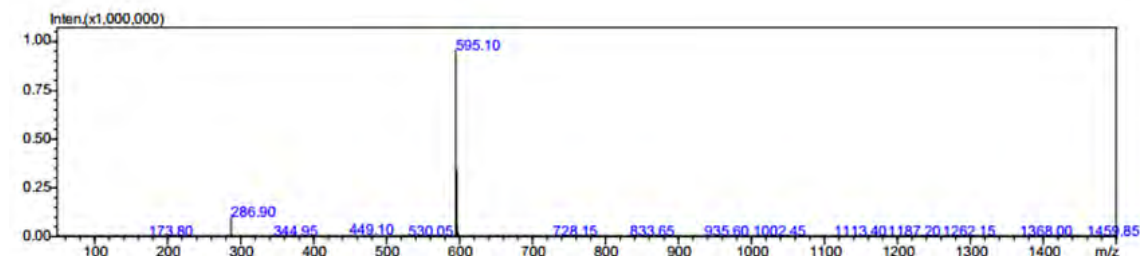
a.



Espectro de masas ESI del **compuesto b.**



Espectro de masas ESI del **compuesto c.**



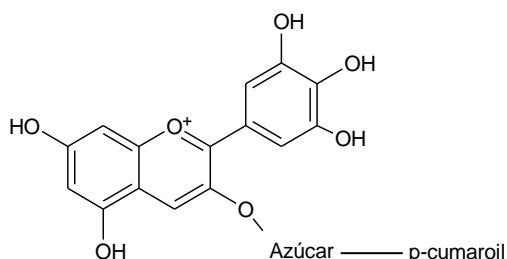
Señal a. Por espectrometría de masas se puede establecer que el peso molecular de este compuesto es 728u. El ion m/z 302,9 indica a la delfinidina como aglicona. El ion m/z 146,7, sugiere la presencia de un grupo cumarilo.

De acuerdo a los análisis realizados por espectroscopía UV-Vis y por HPLC-MS, el compuesto correspondiente a la señal **a** tiene las siguientes características estructurales: la aglicona corresponde a la delfinidina, está sustituida en posición 3 por un azúcar y presenta una acilación. Se propone analizar este compuesto por RMN mono y bidimensional, porque la información dada no es suficiente para

¹⁰⁸ FUENTE: Esta Investigación.

establecer con certeza su estructura, sin embargo se sugiere la siguiente estructura:

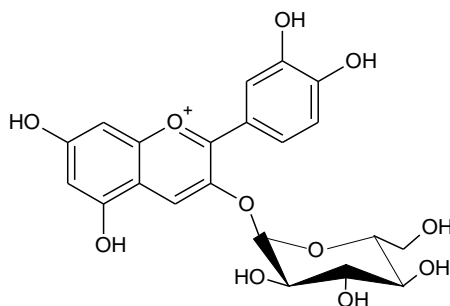
Figura 25. Estructura tentativa de la **antocianina a**¹⁰⁹



Señal b. El peso molecular para esta molécula fue establecido de acuerdo a la señal a 449u del espectro ESI. El ion m/z 287 indica la presencia de cianidina, este ion $[M-162u]$ se origina por la pérdida de una subunidad de glucosa (162u).

Analizando los resultados obtenidos con los diferentes estudios realizados anteriormente se puede concluir que el compuesto correspondiente a la señal b presenta las siguientes particularidades estructurales: el pigmento tiene como aglicona la cianidina, tiene una unidad de azúcar y no tiene en su estructura grupos acilo, además tiene una sustitución en C3, por lo tanto la estructura que se propone para la antocianina b es cianidina-3-O-glucósido.

Figura 26. Estructura de Cianidina-3-O-glucósido¹¹⁰.



Señal c. En este caso el peso molecular de la antocianina de acuerdo al espectro ESI es de 595u. La presencia del ion 287 indica a la cianidina como aglicona. En este compuesto se observa la pérdida de dos unidades de azúcar, una de 146u y otra de 162u que son ramnosa y glucosa respectivamente por lo que el ion que

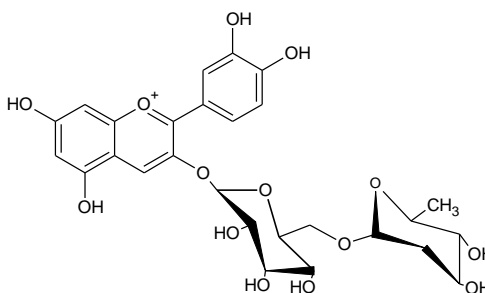
¹⁰⁹ FUENTE: Esta Investigación.

¹¹⁰ FUENTE: Esta Investigación.

corresponde a la aglicona se obtiene de la pérdida de 308u. El ion m/z 449 que se evidencia es el resultado de la pérdida de 146u.

Para el pigmento c, las características estructurales son las siguientes: la aglicona corresponde a cianidina, tiene dos unidades de azúcar, la sustitución se encuentra en el C3 y no posee acilaciones, por lo tanto la antocianina propuesta es cianidina-3-O-rutinósido.

Figura 27. Estructura de Cianidina-3-O-rutinósido¹¹¹.

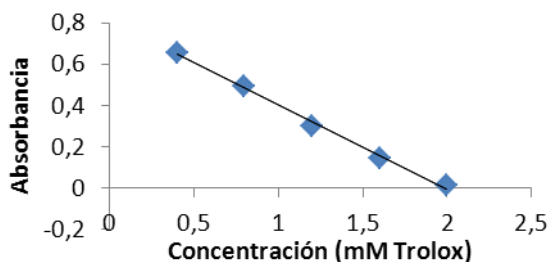


4.7 Capacidad antioxidante.

4.7.1 Capacidad antioxidante equivalente a trolox. Es un método empleado para valorar la actividad antioxidante, este ensayo se basa en la decoloración del radical ABTS y es aplicable tanto a los antioxidantes lipófilos e hidrófilos, incluyendo flavonoides, hidroxicinamatos, carotenoides, y antioxidantes en plasma. El monocatión radical preformado ABTS^{•+} se genera por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio y se reduce en la presencia de antioxidantes.¹¹²

La recta de calibrado realizada con patrones de trolox se observa en la gráfica 4. La ecuación de la recta y = -0,4088x + 0,8117 (R²= 0,9959) con una pendiente negativa, indica la decoloración del catión radical al reaccionar con el antioxidante.

Gráfica 4. Recta de calibración para determinar la capacidad antioxidante en TEAC¹¹³.



¹¹¹ FUENTE: Esta Investigación.

¹¹² Re, R; Pellegrini, N. Op.cit p.,29

¹¹³ FUENTE: Esta Investigación.

La funcionalidad del método se corroboró por medio del uso de un patrón de ácido ascórbico 5 mM. El valor que se obtuvo fue 0,983 mM de Trolox ($\pm 0,005$), cercano al reportado por Re ($1,05 \pm 0,02$).

Se midieron las absorbancias de los extractos ECR, EPR, y de cada una de las fracciones purificadas por HPLC- semi-preparativa.

Tabla 14. Absorbancias de los extractos y de las antocianinas puras en la prueba con el catión radical ABTS^{•+}.¹¹⁴

RÉPLICA	ABSORBANCIA EXTRACTOS		ABSORBANCIA ANTOCIANINAS PURIFICADAS		
	ECR	EPR	1	2	3
1	0,366	0,425	0,648	0,731	0,776
2	0,359	0,423	0,641	0,723	0,773
3	0,358	0,423	0,637	0,723	0,772
Promedio	0,361	0,424	0,642	0,726	0,774
Desv. Est	0,004	0,001	0,006	0,005	0,002
CV	0,012	0,003	0,009	0,006	0,003

Con ayuda de las absorbancias, se calculó el porcentaje de inhibición con la siguiente ecuación: $\% \text{ de Inhibición} = \frac{\Delta Abs}{Abs_{max}} \times 100$

Donde, ΔAbs es la diferencia entre la absorbancia del catión radical y la absorbancia del catión radical con el antioxidante a 734 nm y Abs_{max} es la absorbancia máxima del catión radical a 734 nm.

Gráfica 5. Porcentaje de Inhibición para cada uno de los extractos y las antocianinas purificadas.¹¹⁵



¹¹⁴ FUENTE: Esta Investigación.

¹¹⁵ FUENTE: Esta Investigación.

Tabla 15. Resultados de TEAC¹¹⁶.

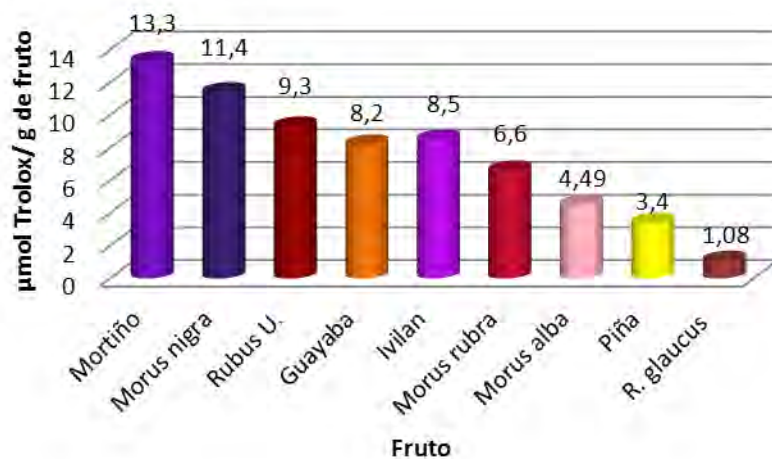
MUESTRA	TEAC
ECR	9,3 ^a
EPR	3,5 ^a
Antocianina a	1,27 ^b
Antocianina b	0,469 ^b
Antocianina c	0,27 ^b

^a $\mu\text{mol Trolox/g}$ de Fruto ^b $\text{mmol de Trolox/mmol de sustancia}$

Los valores obtenidos para cada uno de los extractos se muestran en la tabla 15, en donde el extracto ECR presenta mayor capacidad antioxidante. El extracto EPR tiene una capacidad antioxidante menor puesto que en el proceso de purificación se pudieron haber eliminado algunos compuestos antioxidantes como el ácido ascórbico, que juntamente con las antocianinas generaban un efecto sinérgico beneficiando así su actividad antioxidante. Para las antocianinas puras se tiene que la de mayor actividad antioxidante es la antocianina **a**, seguida de la **b** y por último la **c**. De acuerdo a la estructura planteada para cada una de las antocianinas, la antocianina **a**, al tener en su estructura tres grupos hidroxilo en las posiciones 3', 4' y 5' hace que su actividad antioxidante sea mayor.

En la gráfica 6 se indican los valores de capacidad antioxidante en diferentes variedades de mora y en frutos comerciales.

Gráfica 6. Comparación de la capacidad antioxidante TEAC del fruto de la Mora con otros frutos¹¹⁷.



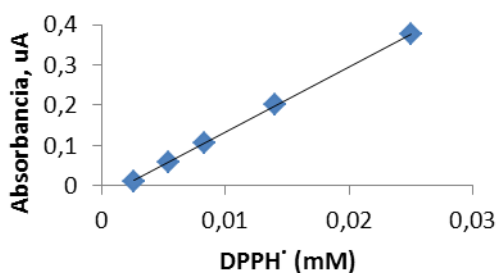
¹¹⁶ FUENTE: Esta Investigación.

¹¹⁷ KUSKOSKI, M. Op.cit.,p.50.

De acuerdo a lo anterior, el valor TEAC de la mora investigada es mucho mayor que el de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth), fruta que presenta gran demanda comercialmente. Comparado con otras variedades de mora, *Rubus urticaefolius* supera a *Morus alba* y *Morus rubra* y sobresale entre frutos comerciales como la piña y la guayaba, sin embargo *Morus Nigra* y el mortiño sobrepasan este valor.

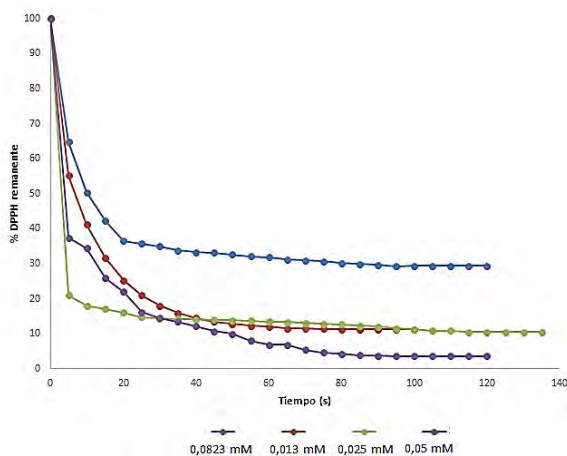
4.7.2 Eficiencia anti-radical. Se estudió la eficiencia anti-radical de los extractos ECR, EPR y de las antocianinas a, b y c. Para ello fue necesario la elaboración de una recta de calibrado (gráfica 7) de absorbancia vs concentración del radical DPPH[•] que arrojó la siguiente ecuación: $y = 16,274x - 0,0296$ ($R^2 = 0,9996$), con esta expresión se calculó [DPPH[•]] a tiempo t.

Gráfica 7. Recta de calibración DPPH[•].¹¹⁸



El ácido ascórbico está clasificado como una sustancia que tiene alta eficiencia anti-radical, por esta razón para tener un punto de referencia se realizó la prueba de DPPH[•] a patrones de ácido ascórbico. La cinética del ácido ascórbico se evidencia en la siguiente gráfica:

Gráfica 8. Comportamiento de diferentes concentraciones de ácido ascórbico frente al radical DPPH[•].¹¹⁹



¹¹⁸ FUENTE: Esta Investigación.

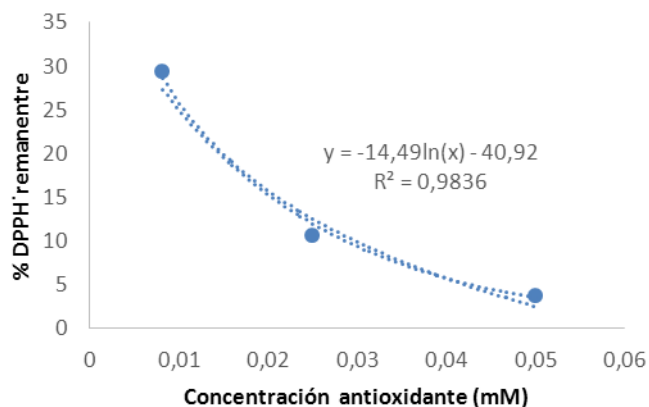
¹¹⁹ FUENTE: Esta Investigación.

La gráfica 8 muestra que una concentración mayor de antioxidante captura en una mayor proporción el radical DPPH y por lo tanto su concentración remanente es menor. A través de la gráfica 9, se pudo determinar la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración de DPPH en un 50% (EC_{50}). El valor calculado fue de $1,9 \times 10^{-3}$ mM, esta concentración es equivalente a 66,9 g de antioxidante/kg de DPPH. Este dato es cercano al publicado en la literatura¹²⁰ cuyo valor para el ácido ascórbico esta en el intervalo de 69-83 g antioxidante/kg de DPPH. El TEC_{50} calculado a través de la gráfica fue de 1,479 minutos. Con los datos anteriores fue posible calcular (mediante la ecuación descrita anteriormente en la sección 2.3.3.1) la eficiencia anti-radical de este antioxidante, el valor encontrado fue de $10,1 \times 10^{-3}$. En la siguiente tabla se muestran los resultados para el ácido ascórbico:

Tabla 16. Eficiencia anti-radical para patrones de ácido ascórbico.

Patrón	Concentración (mM)	%[DPPH'] _{Rem}	Tiempo (min)	EC_{50} (g/kg DPPH)	TEC_{50} (min)	EA $\times 10^{-3}$	EA ¹²¹ $\times 10^{-3}$
Ácido ascórbico	0,00823	29,45	1,67	66,9	1,479	10,1	11,4
	0,013	11,31	1,33				
	0,025	10,57	1,92				
	0,05	3,67	1,58				

Gráfica 9. Curva para determinar el EC_{50} con diferentes concentraciones de ácido ascórbico.¹²²



¹²⁰ SÁNCHEZ, C. Op.cit. p.,31

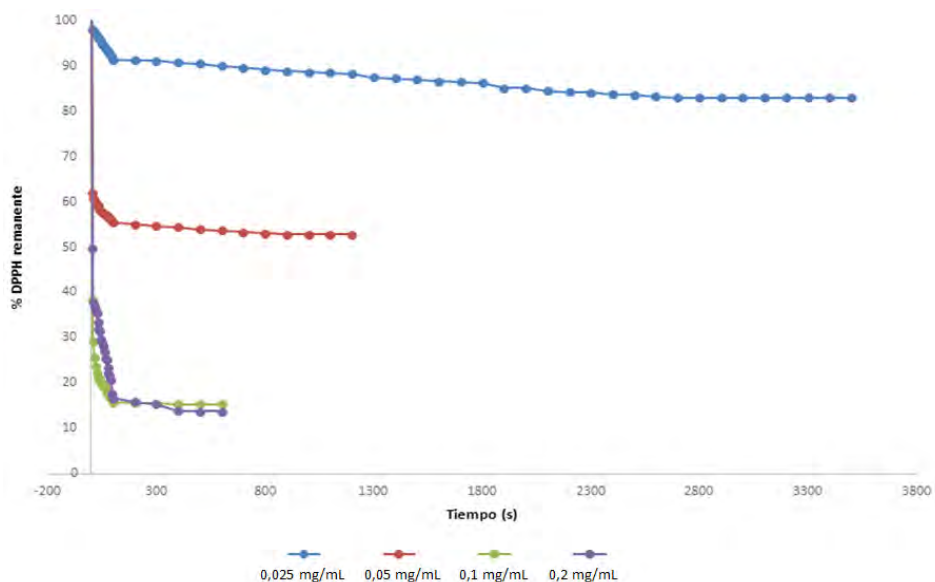
¹²¹ Ibid., p. 61

¹²² FUENTE: Esta Investigación.

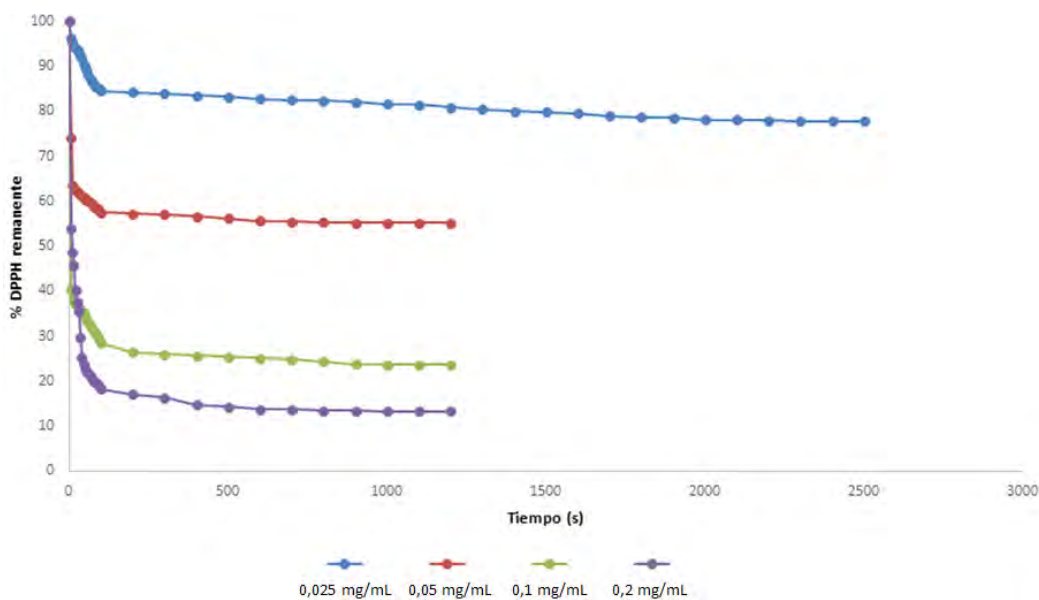
En la gráfica 10 se observa el % DPPH^{Remanente} con respecto al tiempo de reacción para el extracto crudo (ECR), el extracto rico en polifenoles (EPR) y para las antocianinas **a**, **b** y **c**.

Gráfica 10. Cinética de reacción para los diferentes extractos.¹²³

a) Cinética de reacción para el extracto crudo (ECR).

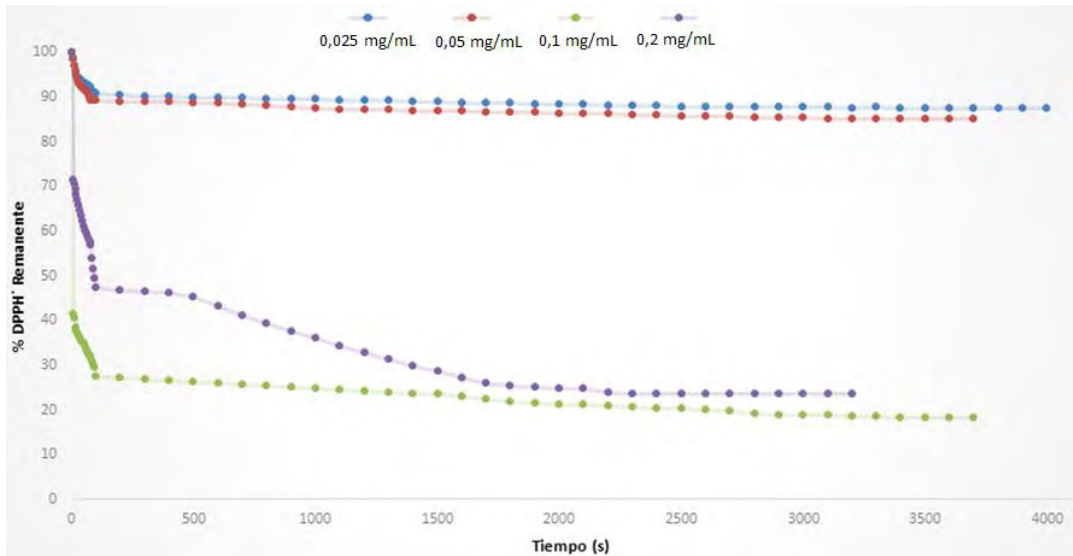


b) Cinética de reacción para el extracto rico en polifenoles (EPR).

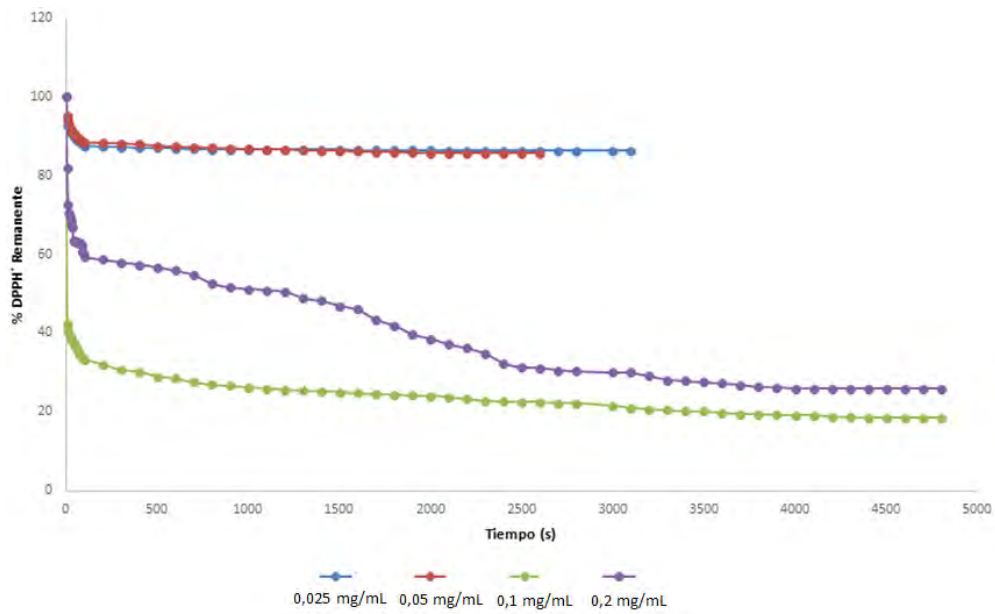


¹²³ FUENTE: Esta Investigación.

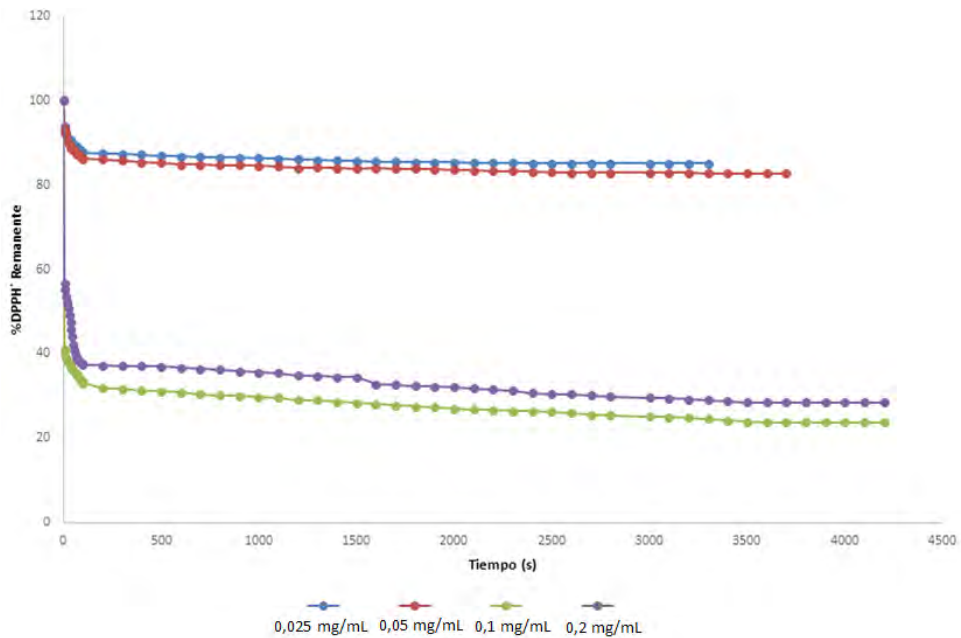
c) Cinética de reacción para la **antocianina a**.



d) Cinética de reacción para la **antocianina b**.



e) Cinética de reacción para la **antocianina c**.



En la grafica 10 igualmente se observa que, para el ECR y EPR, a mayor concentración de antioxidante, menor % DPPH_{Remanente}, también es notable que el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario de las muestras mas diluidas es mayor, lo que comprueba que la eficiencia anti-radical depende claramente de la concentración. Para el caso de la antocianina **a**, es evidente que cuando la concentración del antioxidante es de 0,2 mg/mL la concentración remanente de DPPH[•] en el estado estacionario es menor en comparación con las concentraciones más diluidas. A bajas concentraciones de antioxidante se evidencia que el tiempo de reacción y el % DPPH_{Remanente} es mayor. En cuanto a las antocianinas **b** y **c**, la mejor concentración para obtener un % DPPH_{Remanente} bajo es 0,1 mg/mL, los tiempos de reacción para esta concentración y para 0,2 mg/mL son similares, sin embargo con concentraciones de antioxidante iguales a 0,025 y 0,05 mg/mL se obtienen menores tiempos de reacción.

Mediante la gráfica de concentración de antioxidante vs % DPPH_{Remanente} se calculó el EC_{50} (ver Anexo A). El TEC_{50} se obtuvo a partir de la gráfica % DPPH_{Remanente} vs tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario. Con estos dos parámetros se calculó la eficiencia anti-radical, los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 17. Eficiencia anti-radical (EA) de los extractos y las antocianinas presentes en el fruto de la Mora.¹²⁴

Extracto	Concentración (mg/mL)	% DPPH [·] Remanente	Tiempo (s)	EC ₅₀ (g/Kg DPPH)	TEC ₅₀ (min)	EA x10 ⁻³
ECR	0,025	82,9	3500	2750	18,06	0,023
	0,05	52,8	1200			
	0,1	15,3	600			
	0,2	13,7	600			
EPR	0,025	77,72	2400	2800	13,68	0,026
	0,05	55,12	900			
	0,1	23,83	900			
	0,2	13,35	1000			
a	0,025	87,69	2600	3250	94,79	0,0033
	0,05	85,15	3100			
	0,1	18,31	3400			
	0,2	23,62	2300			
b	0,025	86,20	2400	3250	57,42	0,0054
	0,05	85,68	2000			
	0,1	18,52	4400			
	0,2	25,84	4100			
c	0,025	85,15	2400	3450	48,97	0,0059
	0,05	82,71	3300			
	0,1	23,72	3700			
	0,2	28,5	3500			

Según la clasificación para los antioxidantes hecha por Sánchez¹²⁵, los extractos del fruto de la Mora presentan una eficiencia anti-radical baja ($EA \leq 1 \times 10^{-3}$). El extracto crudo y el rico en polifenoles tienen mayor eficiencia anti-radical con respecto a las antocianinas purificadas, pero de acuerdo a los resultados se puede decir que el extracto purificado presenta una mayor eficiencia anti-radical. Entre las tres antocianinas mayoritarias presentes en el fruto, se encontró que la antocianina **c**, es más eficiente inhibiendo radicales que **b** y que **a**. se propone que esta tendencia se debe a la mayor cantidad de grupos hidroxilo en la molécula.

En relación con la prueba realizada con el ABTS⁺⁺, se encuentran ciertas particularidades para el extracto ECR y EPR, mientras que el primero presenta mayor capacidad antioxidante, su eficiencia anti-radical es menor con respecto al extracto rico en polifenoles, pero a su vez este último tiene menor capacidad antioxidante. La antocianina **a**, tiene menor eficiencia anti-radical, pero entre **b** y **c**, es la que posee mayor capacidad antioxidante. La antocianina **c** tiene mayor eficiencia anti-radical pero menor capacidad antioxidante. Se puede notar que es necesaria la aplicación de los dos métodos puesto que estos se complementan

¹²⁴ FUENTE: Esta Investigación.

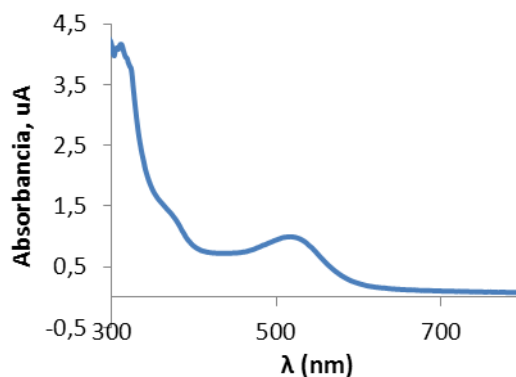
¹²⁵ SÁNCHEZ, C. Op.cit. p.,31

entre si, brindando una información más clara del comportamiento de los extractos.

4.8 Análisis del color.

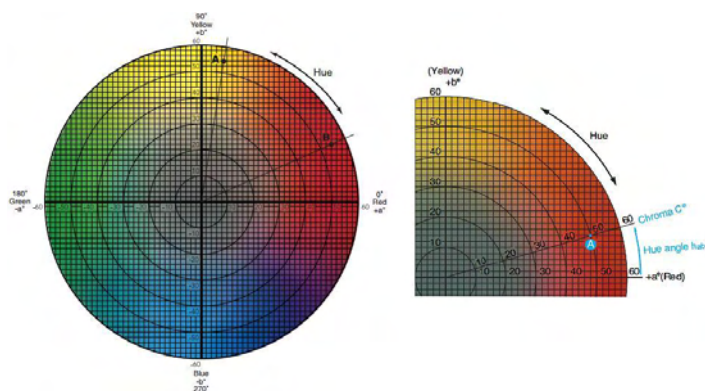
En la figura 28 se observa el espectro en la región visible del extracto crudo de Mora a pH 1, se puede notar que se presenta una absorción considerable en la región visible, pero para profundizar un poco más en esta área, se realizaron estudios por medio de la colorimetría triestímulo.

Figura 28. Espectro UV-Vis de la mora a pH 1¹²⁶.



Los parámetros CIELAB (L^* , a^* , b^*) de los extractos, se determinaron de acuerdo con las especificaciones CIE usando el software CromaLab¹²⁷ (Heredia et al, 2004).

Figura 29. Diagrama de cromaticidad del espacio de color L^* a^* b^* (Matiz y saturación)



¹²⁶ FUENTE: Esta Investigación.

¹²⁷ HEREDIA, F.J; ÁLVAREZ, C; GONZÁLEZ-MIRET, M.L; RAMIREZ, A. CromaLab, análisis de color. Registro General de la Propiedad Intelectual, SE-1052-04, Sevilla, Spain. 2004.

La estabilidad del color del fruto de la mora para el extracto crudo (ECR) a diferentes valores de pH se estudió por medio de los parámetros de espacio de color CIELAB, L* (luminosidad), Cab* (croma), h*ab (matiz). El croma representa la distancia lejos del tono gris (es decir, el grado de saturación de color) en una escala de 0 a 100. De acuerdo a la tabla 18 se puede observar que a medida que el pH pasa del rango ácido al básico, la claridad disminuye. Se observa un valor máximo para L* que indica que el color es más claro a pH 1,06. Los valores para la coordenada a* indican que desde pH 1,056 a 5,56 sufre una disminución cuantiosa de este parámetro, en cambio los valores para la coordenada b* en el rango ácido no sufren aumentos representativos pero cuando el pH tiende a ser básico, estos valores se incrementan. Los resultados muestran además que el más bajo Cab* fue a pH 5,5. Los bajos valores de Cab* indican que la saturación del color disminuyó. Los valores de hab indican cambios de color a diferentes pH's, del rango ácido al básico se observa de acuerdo a los parámetros colorimétricos que la solución cambia de color rojo intenso a amarillo, posteriormente a amarillo verdoso y finalmente a verde oscuro como se observa en la figura 30. Es conocido que a pH 1 se favorece el equilibrio hacia la formación de la especie catión flavilio por lo que las antocianinas son más estables en su estructura y color.

Figura 30. Cambios de color del rango de pH ácido al básico¹²⁸.



Tabla 18. Variación de los parámetros del color con respecto al pH¹²⁹.

pH	L*	a*	b*	C*ab	hab
1,060	61,617	42,345	21,884	47,666	27,330
1,100	61,645	42,172	21,904	47,521	27,447
1,230	61,885	41,902	22,038	47,344	27,741
1,760	62,024	39,918	22,165	45,659	29,042
2,530	61,320	34,343	22,299	40,948	32,995
5,560	56,966	15,874	23,991	28,767	56,508
10,410	48,636	17,099	49,144	52,034	70,815
11,960	44,142	21,351	61,617	65,212	70,888
12,430	41,777	24,161	65,497	69,811	69,751
12,800	43,330	29,031	71,661	77,318	67,947
13,090	42,541	32,272	71,497	78,443	65,706

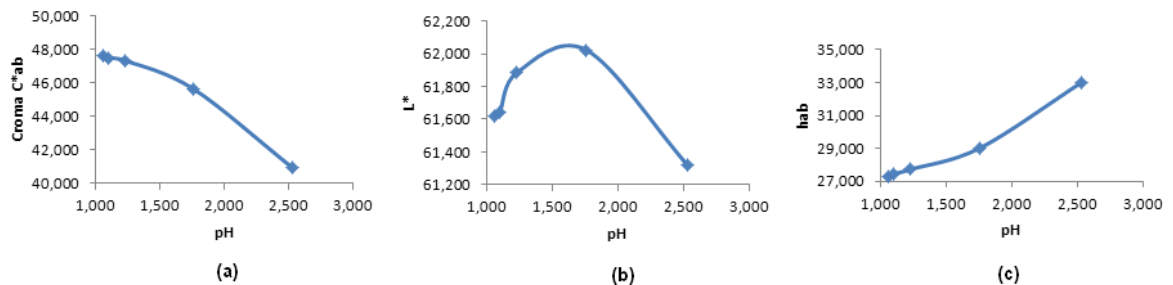
¹²⁸ FUENTE: Esta Investigación.

¹²⁹ FUENTE: Esta Investigación.

De acuerdo a la figura 4, se presentan las estructuras de las antocianinas a diferentes valores de pH y en reportes realizados por Zhenxin Gu¹³⁰ el color rojo de las antocianinas (catión flavilio) se transforma en bases quinoidales azules o pseudobases carbinol incoloras a medida que se aumenta el pH.

En la figura 31 (a) se evidencia que el más alto Cab* se encontró a pH 1,06, esto significa que el color está más saturado o puro, por eso a este pH el extracto presenta una coloración roja intensa. En cuanto a claridad el color es más claro a pH 1,7, a medida que el pH en el extracto aumenta, hay una tendencia a tonos más oscuros.

Figura 31. Cambios en (a) el cromatismo (C*ab), (b) claridad (L*); y (c) el tono (hab) del extracto crudo de Mora con respecto al pH en el rango ácido.¹³¹



¹³⁰ ZHENXIN, G; GONGJIAN, F; YONGBIN H; FEIRONG, G. Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato culture. En: Food Science and Technology. Vol. 41 (2008); p. 1412–1416.

¹³¹ FUENTE: Esta Investigación.

CONCLUSIONES

El método de obtención del extracto rico en polifenoles por medio de la resina XAD-7 y las fracciones ricas en antocianinas monoméricas y poliméricas separadas por cromatografía de exclusión por tamaño demostró ser eficiente. Esto se corroboró al observar los resultados de las pruebas de fenoles totales, pH diferencial y pH sustractivo donde es notable el incremento de los valores del extracto purificado con respecto al extracto crudo.

Las antocianinas mayoritarias en el fruto de la mora que se encontraron fueron las siguientes: Cianidina-3-O-glucósido y Cianidina-3-O-rutinósido y tentativamente la antocianina que tiene como aglicona a la delphinidina la cual está acilada.

Los métodos TEAC y DPPH, proporcionaron información acerca de la capacidad antioxidante y de la eficiencia anti-radical de los diferentes extractos. El extracto ECR presentó un porcentaje de inhibición del radical ABTS mayor que el extracto purificado, pero su eficiencia anti-radical fue menor que el extracto EPR. Entre las antocianinas, la antocianina **a** superó en capacidad antioxidante a la antocianina **b** seguida de la antocianina **c**, sin embargo al estudiar el comportamiento de su eficiencia para atrapar radicales, la antocianina **c** se destacó sobre **b** y **a**.

La mora objeto de estudio al compararse con otros frutos en cuanto a contenido fenólico supera a *Morus nigra* y en contenido antociánico sobrepasa a la uva, fresa, guayaba y açai. Así también, *Rubus urticaefolius* tiene mayor capacidad antioxidante que la guayaba, la piña y la mora de castilla (*Rubus glaucus*).

A través del estudio de la colorimetría triestímulo se pudo establecer que el extracto crudo presenta variaciones de los parámetros croma, luminosidad y matiz a medida que el pH aumenta. Estas mediciones son importantes para posteriores estudios que se enfoquen en la búsqueda de aplicaciones en la industria y en alimentos.

RECOMENDACIONES

Para realizar la elucidación estructural de las moléculas inequívocamente se recomienda realizar la purificación de estos compuestos en una mayor cantidad, puesto que los análisis contemplan estudios de resonancia magnética nuclear protónica, ^{13}C y experimentos bidimensionales como HSQC, HMQC, NOESY y TOCSY. Estas técnicas proporcionan información acerca de los tipos de azúcar enlazados y su configuración anomérica.

BIBLIOGRAFÍA

AVELLO, M; SUWALSKY, M. Radicales Libres, Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular. En: Revista Atenea- Universidad de Concepción. Vol 494 (II Sem. 2006); p. 161-172.

BIANCHINI, R.S. Rosaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro [en línea] <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br.htm>>. 20 de Noviembre de 2012.

BRAVO L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. En: Nutrition Review. Vol. 56, No 11 (1998); p. 317-333.

CAMPOS, J; PONS, A; HEREDIA, F.J. Instrumental factors influencing absorption measurements for fluid food color determination. En: J. AOAC, Int. Vol 87 (2004); p. 632-638.

C.I.E. (1971).Colorimetry, (Official recommendations of the International Commission on Illumination) CIE Publicación No. 15 (E-1.3.1). Tercera edición, Bureau Central de la CIE, Paris, actualización: CIE 15: 2004.

DA COSTA, C; HORTON, D; MARGOLIS, S. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass espectrometry and capillary electrophoresis. En: Journal of chromatography, Vol. 881, No 1-2 (2000); p. 403-410.

DAVIES, A; MAZZA, G. Copigmentation of simple and acylatedanthocyanins with colorless phenolic compounds. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 4,1 No 5 (1993); p. 716–720.

DU, Q; ZHENG, J; XU, Y. Composition of anthocyanins in mulberry and their antioxidant activity. En: Journal of Food Composition and Analysis. Vol. 21, No 5 (2008); p. 390-395.

DURST; R, WROLSTAD; RE. Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. En: Handbook of Food Analytical Chemistry. New Jersey: John Wiley & Sons; 2001. p. 33-45.

EINBOND, R.G; REYNERTSON, K.A; XIAO DONG, L; BASILE, MJ; KENNELLY, EJ. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. En: Food Chemistry. Vol. 84, (2004); p. 23-28.

ELISIA, I; HU, C; POPOVICH, D; KITTS, D. Antioxidant assessment of an anthocyanin-enriched blackberry extract. En: Food Chemistry. Vol.101, No 3 (2007); p.1052-1058.

ERCISLI, S; ORHAN E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. En: Food Chemistry. Vol. 103, No 4 (2006); p. 1380-1384.

ESCRIBANO, M; SANTOS, C; JULIAN, C; RIVAS, G. Antocyanins in cereals. En: Journal of chromatography. Vol. 1054, No 1-2 (2004); p.129-141.

FINKEL, T; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. En: Nature. Vol. 408, (2000); p. 23-247.

FOLIN, C.; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. En: Journal Biological Chemistry. Vol. 73, No 2 (1927); p. 627-650.

GARCÍA, C; BRIDLE, P. Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid. En: Food Chemistry. Vol. 64, No 1 (1999); p. 21-26.

GARZÓN, GA; RIEDL, KM; SCHWARTZE, SJ. Determination of Anthocyanins Total Phenolic Content, and Antioxidant Activity in Andes Berry (*Rubus glaucus Benth*). En: Journal Food Chemistry. Vol. 74, No 3 (2009); p. 227-232.

GARZÓN, GA; WROLSTAD, R. Comparison of the Stability of Pelargonidin-based Anthocyanins in Strawberry Juice and Concentrate. En: Journal Food Science. Vol. 67, No 4 (2002); p.1288-1299.

GREENWALD, R. Current approaches to the development of oxygen radical scavenger. En: Drugs of Today. Vol. 26, (1990); p. 299-307.

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

GHISELLI, A; NARDINI, M; BALDI, A; SCACCINI, C. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol 46, No 2 (1998), p. 361.

GIUSTI, M; RODRIGUEZ, L; WROLSTAD, R. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and no-acylated pelargonidin-based anthocyanins. En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol. 47, No 11 (1999); p. 4631-4637.

GIUSTI, M; WROLSTAD, R. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-Visible spectroscopy. En: Current Protocols in Food Analytic Chemistry, (2003); F1.2.1-F1.2.9

HAGIWARA, A; MIYASHITA, K; NAKANISHI, T; SANO, M; TAMANO, S. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. En: Journal Toxicology Science. Vol 171, No 1 (2001); p. 17-25.

HUTCHINGS, JB. Food Colour and Appearance. Blackie Academic & Professional, Glasgow, Estados Unidos, 1994.

HORBOWICZ, M; KOSSON, R; GRZESIUK, A; DEBSKI, H. Anthocyanins of Fruits and Vegetables-their occurrence, analysis and role in human nutrition. En: Vegetables Crops Research Bulletin. Vol. 68 (2008); p. 5-22.

HYOUNG, S; LEE, V. Chromatographic analysis of anthocyanins. En: Color Research & Application. Vol. 19, No 6, (1994); p. 484-485.

JIMÉNEZ, J; VILLARREAL, J. Estudio químico de pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del Motilón (*Hyeronima macrocarpa*). San Juan de Pasto, 2008, 104h. Trabajo de grado (Químico). Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Química.

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

JOSEPH, JA; SHUKITT-HALE, B, DENISOVA, NA; BIELINSKI, DB, MARTIN, A; MCEWEN, JJ. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction cognitive and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. En: Journal Neuroscience. Vol. 19, No 18 (1999); p. 8114.

KAMEI H, HASHIMOTO Y, KOIDE T, KOJIMA T, HASEGAWA M. Anti-Tumor Effect of Methanol Extracts from Red and White Wines. En: Cancer Biother Radiopharmaceuticals. Vol. 13, No 6 (1998); p. 447-52.

KOSIR, I. J; KIDRIC, J. Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds. En: Analytica Chimica Acta. Vol 458 (2002); p. 77-84..

KUSKOSKI, E; VEGA, J; RIO, J; FETT, R; TRONCOSO, A; ASUERO, A. Characterization of anthocyanins from the fruits of Baguacu (*Eugenia umbelliflora*

Berg). En: International Journal of Sociology of Agriculture and Food. Vol. 51(2003); p. 5450-5454.

KUSKOSKI, M; ASUERO, A. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. En: Ciencia y Tecnología de alimentos. Vol. 25, No 4 (2005); 726-732.

MARKAKIS, P; LIVINGSTON, G; FELLERS, R. Quantitative Aspects of Strawberry Pigment Degradation. En: Food Research. Vol. 22, No 2 (1957); p. 117-130.

MARTÍNEZ A. Flavonoides. Medellín, 2005. Universidad de Antioquia, Facultad de química farmacéutica. p. 76.

MARTÍNEZ FLÓREZ S, GONZÁLEZ GALLEGO J. Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. En: Nutrición Hospitalaria. Vol. 17, No 6 (2002); p. 271-278.

MATSUFUJI, H; OTSUKI, T; TAKEDA, T; CHINO, M; TAKEDA, M. Identification of reaction products of acylatedanthocyanins from red radish with peroxy radicals. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 51, No 10 (2003); p. 3157–3161.

MIYAZAWA, T; NAKAGAWA, K; KUDO, M; MURAISHI, K; SOMEYA K. Direct Intestinal Absorption of Red Fruit Anthocyanins, Cyanidin-3-Glucoside and Cyanidin-3,5-Diglucoside, Into Rats and Humans. En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol 47, No 3, (1999); p. 1083.

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

NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC 4106. Frutas frescas. Mora de Castilla. Especificaciones.

OHGAMI, K; ILIEVA, I; SHIRATORI, K, KOYAMA, Y, JIN, XH; YOSHIDA, K. Anti-inflammatory Effects of Aronia Extract on Rat Endotoxin-Induced Uveitis. En: Investigative Ophthalmology & Visual Science. Vol 46, No 1 (2005); p. 275-281.

OKEZIE, I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. En: Mutation research. Vol. 523-524, (2003); p. 9-20.

OZGEN, M; SERCE, S; KAYA, C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. En: Scientia Horticulturae. Vol. 119, No 3 (2008); p. 275-279.

PANNALA, AS; CHAN, TS; O'BRIEN, P; RICE-EVANS, C. Flavonoid Binding chemistry and antioxidant activity: fast-reaction kinetics. En: Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 282, (2001); p. 1161-1168.

PEROSSINI, M; GUIDI, G; CHIELLINI, S; SIRAVO, D Studio Clinico Sull' impegno Degli Antocianisidi del Mirtillo (Tegens) nel Trattamento Delle Microangiopathi Retiniche di Tipo Diabetico ed Ipertensivo. En: Ottal Clinical Ocular. Vol. 113, (1987); p.1173-90.

PEREZ T. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. En: Revista cubana de investigaciones biomédicas. Vol. 22, No 1 (2003); p. 48-57.

RE, R; PELLEGRINI, N; PROTEGGENTE, A; PANNALA, A; YANG, M; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical. Biology. & Medicine. Vol. 26, No 9-10 (1999); p. 1231-1237.

SALDAÑA M., Efecto de la copigmentación sobre la expresión de color en sistemas modelo de ciruela (*Prunus domestica*), Puebla (México) 2004. Trabajo de grado (Licenciatura en quimicofarmacobiología). Escuela de ciencias, Universidad Las Américas. p. 123.

SÁNCHEZ, C; LARRAURI, J; SAURA, C. A procedure to measure the anti-radical efficiency of polyphenols. En: Journal of science of food and agriculture. Vol 76, (1998); p. 270- 276.

SCALZO, J; POLITI, A; PELLEGRINI, N; MEZZETTI, B; BATTINO, M. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol. 21, No 2, (2005); p. 207-213.

SHUKITT-HALE, B; GALLI, RL; METERKO, V; CAREY, A; BIELINSKI, DF; MCGHIE, T, et al. Dietary Supplementation with Fruit Polyphenolics Ameliorates Age-related Deficits in Behavior and Neuronal Markers of Inflammation and Oxidative Stress. En: Springer review. Vol. 27 (2005); p. 49-57.

SONDHEIMER, E; KERTESZ, ZI. Participation of Ascorbic Acid in the Destruction of Anthocyanin in Strawberry Juice and Model Systems. En: Food Research. Vol. 18, No 1-6 (1953); p. 475.

STINTZING, FC; STINTZING, AS; CARLE, R; FREI, B; WROLSTAD, R. Color and Antioxidant Properties of Cyanidin-based Anthocyanin Pigments. En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol. 50, No 21, (2002); p.61-72.

TIMBERLAKE, CF. Anthocyanins - Occurrence, extraction and chemistry. En: Journal Food Chemistry. Vol. 5, No 1, (1980); p.69.

TRISTAN, F; MOUL, D; ROGERS, RBD; RIBNICKY, DM; GIPP, WT. Phytochemical Composition and Metabolic Performance-Enhancing Activity of Dietary Berries. En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol 56, (2008); p. 654.

VAILLANT, F; ACOSTA-MONTOYA, O; COZZANO, S. S; MERTZ, C; PÉREZ, A; CASTRO, M. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) during three edible maturity stages. En: Food Chemistry. Vol. 119, 4, (Sept 2009); p 1497–1501.

VUORELA, S; KREANDER, K; KARONEN, M; NIEMINEN, R; HÄMÄLÄINEN, M; GALKIN, A. In vivo treatment of acute *Chlamydia pneumoniae* infection with the flavonoids quercetin and luteolin and an alkyl gallate, octylgallate, in a mouse model. En: Biochemical Pharmacology. Vol 70, No 8 (2005); p. 1222-1230.

WANG, J; MAZZA, G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN γ - activated RAW 2647 macrophages. En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol 50, No 4 (2002); p. 850.

WROLSTAD, R; ROBERT, W; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. En: Food science and technology. Vol.16, No 9 (2005); p. 423-428.

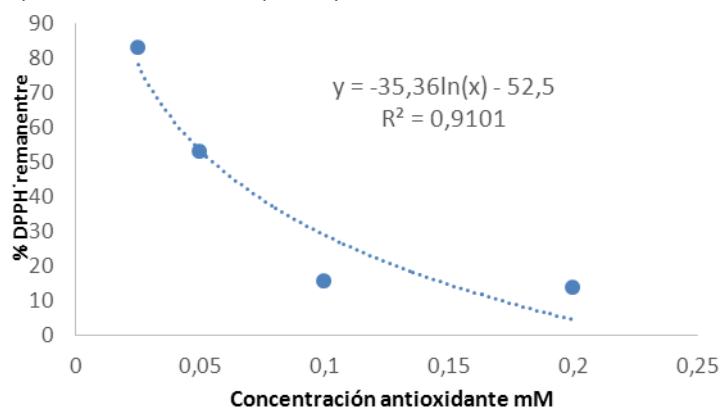
WU, X; LINGHONG, L; ZOU, Y; ZHAO, T; ZHAO, J; LI, F; YANG, L. Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb). En: Food Chemistry. Vol. 129, No 2 (2011); p. 443-453.

YANG, Z; ZHAI, W. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). En: Innovative Food Science and Emerging Technologies. Vol.11, No 1 (2009); p.169-176.

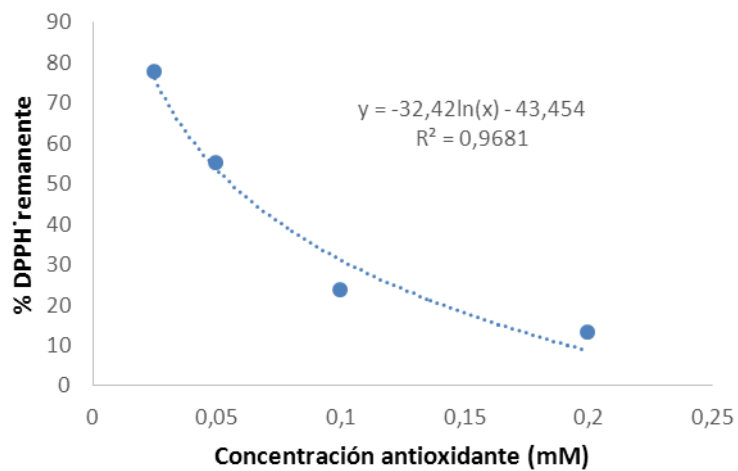
ANEXOS

Anexo A. Gráficas para calcular el Ec_{50}

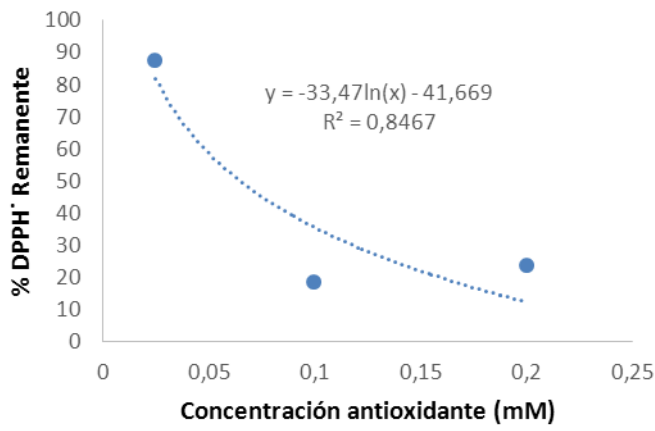
a) Extracto crudo (ECR)



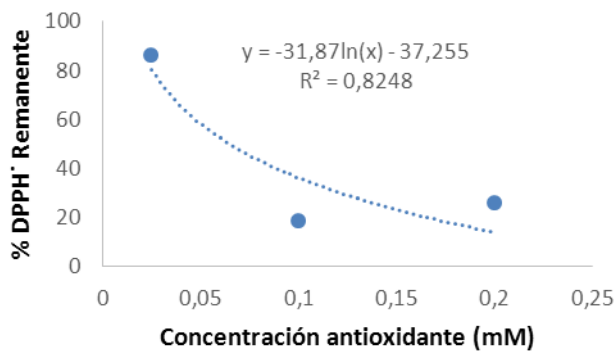
b) Extracto rico en polifenoles (EPR)



c) Antocianina a



d) Antocianina b



e) Antocianina c

