

ANÁLISIS QUÍMICO, ESTABILIDAD Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA IN VITRO DE LA  
FRACCIÓN DE POLIFENOLES DEL FRUTO DE CAPULÍ (*Prunus serotina Ehrh. var.*  
*Capulí*).

MILENA PÉREZ SEGURA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
SAN JUAN DE PASTO  
2013

ANÁLISIS QUÍMICO, ESTABILIDAD Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA IN VITRO DE LA  
FRACCIÓN DE POLIFENOLES DEL FRUTO DE CAPULÍ (*Prunus serotina* Ehrh. var.  
*Capulí*).

MILENA PÉREZ SEGURA

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

Director

NELSON HUMBERTO HURTADO  
Ph. D. Ciencias Químicas

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
SAN JUAN DE PASTO  
2013

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 del honorable consejo directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

Nelson Humberto Hurtado Gutiérrez  
Director

Coralia Osorio Roa  
Jurado

Linay Santacruz Gutiérrez  
Jurado

San Juan de Pasto, Octubre de 2012

## AGRADECIMIENTOS

A mi director, Dr. Nelson Hurtado por su apoyo y orientación, durante la realización del presente trabajo.

A la vicerrectoría de investigaciones, posgrados y relaciones internacionales (VIPRI) de la Universidad de Nariño por su apoyo financiero para la realización de esta investigación.

A los jurados Coralia Osorio Roa y Linay Santacruz Gutiérrez por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo.

A los profesores y laboratoristas del programa de Química de la Universidad de Nariño por sus enseñanzas y colaboración durante mi formación profesional, en especial, a los químicos David Arturo y Juan Pablo Jimenéz por su colaboración y amistad brindada.

A mis padres Carlos y Myriam por su amor incondicional, junto con toda mi familia, quienes me brindaron su apoyo siempre.

A mis amigos con quienes tuve la oportunidad de compartir gratos momentos Francisco, Silvia, Maritza, Natalia...

## DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia, quienes estuvieron a mi lado, con su amor y apoyo incondicional, brindándome lo mejor; y a mi hijo, quién siempre me ánimo a seguir adelante. Gracias a todos.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	17
1 Objetivos.....	19
1.1 Objetivo general.....	19
1.2 Objetivos específicos .....	19
2 Marco referencial .....	20
2.1 Antecedentes.....	20
2.2 Marco contextual.....	22
2.3 Marco teórico.....	23
2.3.1 Compuestos fenólicos en plantas .....	23
2.3.2 No flavonoides.....	25
2.3.2.1 Taninos hidrolizables.....	25
2.3.2.2 Hidroxicinamatos.....	26
2.3.2.3 Estilbenos.....	27
2.3.3 Flavonoides.....	27
2.3.3.1 Flavonoles.....	31
2.3.3.2 Flavonas.....	31
2.3.3.3 Flavan-3-ol.....	32
2.3.3.4 Flavanonas.....	33
2.3.3.5 Antocianidinas.....	33
2.3.4 Antocianinas.....	35
2.3.4.1 Estructura química.....	37
2.3.4.2 Método de extracción, separación y purificación.....	39
2.3.4.3 Métodos de detección y caracterización.....	40
2.3.5 Otros métodos de análisis.....	43
2.3.5.1 Cuantificación de antocianinas monoméricas.....	43
2.3.5.2 Color polimérico.....	45
2.3.5.3 Fenoles totales.....	46

2.3.6 Estabilidad del color de las antocianinas.....	47
2.3.7 Encapsulamiento con alginato de sodio.....	51
2.3.8 Capacidad antioxidante in vitro.....	52
3 Metodología.....	56
3.1 Extracción del pigmento.....	56
3.1.1 Recolección del material vegetal.....	56
3.1.2 Determinación de la madurez.....	57
3.1.3 Obtención del extracto crudo.....	57
3.1.4 Obtención del extracto rico en polifenoles.....	57
3.1.5 Obtención del extracto rico en antocianinas monoméricas.....	58
3.1.6 Análisis por HPLC analítica.....	59
3.1.7 Purificación de pigmentos mayoritarios por HPLC preparativa.....	60
3.2 Caracterización del pigmento.....	60
3.2.1 Cromatografía de capa fina.....	60
3.2.2 Caracterización por espectroscopía UV/Vis.....	61
3.2.3 Caracterización de los componentes mayoritarios por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS).....	61
3.2.4 Determinación del espectro RMN <sup>1</sup> H para los componentes mayoritarios..	61
3.3 Cuantificación de antocianinas.....	62
3.3.1 Antocianinas monoméricas.....	62
3.3.2 Antocianinas poliméricas.....	62
3.3.3 Fenoles totales.....	62
3.4 Determinación de la estabilidad.....	63
3.5 Determinación de la capacidad antioxidante in vitro por el método TEAC..	64
4 Análisis de resultados.....	66
4.1 Ensayos previos.....	66
4.1 Determinación del grado de madurez del fruto.....	66
4.3 Cuantificación de los extractos obtenidos.....	67
4.3.1 Determinación de antocianinas monoméricas totales.....	67
4.3.2 Determinación de antocianinas poliméricas.....	69
4.3.3 Determinación de fenoles totales.....	70

4.4 Separación y caracterización de los componentes mayoritarios.....	71
4.4.1 Cromatografía de capa delgada (CCD) de la fracción de antocianinas monoméricas. ....	72
4.4.2 Análisis por HPLC modo analítico del extracto EP.....	73
4.4.3 Análisis por HPLC en modo preparativo del extracto EP.....	76
4.4.4 Espectros UV-Vis de los pigmentos antociánicos aislados.....	77
4.4.5 Elucidación estructural.....	79
4.5 Determinación de la capacidad antioxidante por el método TEAC.....	98
4.6 Estudio de la estabilidad de los extractos EC y EP.....	100
4.6.1 Determinación de los parámetros cinéticos de degradación para los extractos EC y EP. ....	101
4.6.2 Encapsulamiento del extracto EP.....	105
CONCLUSIONES.....	108
RECOMENDACIONES.....	109
BIBLIOGRAFÍA.....	110

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Antocianidinas más comunes presentes en la naturaleza.....	29
Tabla 2. Características iniciales del fruto de Capulí ( <i>Prunus serótina</i> Ehrh).....	63
Tabla 3. Absorbancias para el extracto EC y EP a pH 1.0 y 4.5.....	65
Tabla 4. Contenido de antocianinas monoméricas para el extracto EC y EP.....	64
Tabla 5. Contenido polimérico de los extractos EC y EP.....	66
Tabla 6. Resultados obtenidos del método de Folin con patrones de ácido gálico...	67
Tabla 7. Contenido fenólico para los extractos EC y EP.....	66
Tabla 8. Tiempos de retención y porcentajes de área para las señales obtenidas en el extracto EP del fruto de Capulí.....	71
Tabla 9. Tiempos de retención y porcentaje de área para los compuestos mayoritarios contenidos en la primera fracción obtenida por sephadex. ....	73
Tabla 10. Tiempos de retención y porcentaje de área para los compuestos mayoritarios contenidos en la segunda fracción obtenida por sephadex.....	73
Tabla 11. Parámetros espectroscópicos UV-Vis para las antocianinas mayoritarias presentes en el fruto de Capulí.....	76
Tabla 12. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ para las antocianinas 1 y 2 de RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ en ppm, $J$ en Hz). MeOH-d <sub>4</sub> .....	94
Tabla 13. Desplazamientos químicos del espectro RMN $^{13}\text{C}$ para las antocianinas 1 y 2 ( $\delta$ en ppm). MeOH-d <sub>4</sub> .....	95
Tabla 14. Datos de absorbancia de los extractos EC, EP y las dos antocianinas obtenidas por HPLC preparativa .....	97
Tabla 15. Capacidad antioxidante de los extractos EC, EP y las dos antocianinas aisladas por HPLC preparativa.....	97
Tabla 16. Notación y combinación de las diferentes variables utilizadas para el estudio de la estabilidad de las muestras.....	100
Tabla 17. Notación y combinación de las diferentes variables utilizadas para el estudio de la estabilidad de las muestras.....	100
Tabla 18. Parámetros cinéticos de degradación de antocianinas para los extractos EC y EP a diferentes condiciones de almacenamiento.....	105

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frutos de Capulí ( <i>Prunus serotina</i> Ehrh).....	17
Figura 2. Estructura química de ácido gálico, principal componente de los taninos..	20
Figura 3. Estructura química de hidroxicinamatos más comunes.....	21
Figura 4. Estructura química del estilbeno más común, <i>trans</i> -Resveratrol y su derivado glicosilado.....	21
Figura 5. Estructura básica de la mayoría de flavonoides (2-fenil-benzopirilio).....	22
Figura 6. Esquema de la ruta biosintética de principales flavonoides.....	24
Figura 7. Estructuras químicas de flavonoles de camferol y quercetina.....	25
Figura 8. Estructuras químicas de flavonas de epigenina y tangeretina.....	26
Figura 9. Estructuras de flavan-3-ol más comunes.....	27
Figura 10. Estructura química de flavanonas más comunes.....	28
Figura 11. Estructura general de una antocianidina.....	28
Figura 12. Estructura química de antocianidinas más comunes.....	30
Figura 13. Estructura general de una antocianina.....	33
Figura 14. Estructura de azúcares más comunes en antocianinas.....	33
Figura 15. Espectro UV-Vis de antocianinas a pH 1 y pH 4.5.....	40
Figura 16. Estructuras del catión flavilio (A) y la forma hemiacetal (B) (R representa los sustituyentes glicosídicos.).....	40
Figura 17. Reacción de antocianinas con bisulfito para formar un derivado de ácido sulfónico incoloro.....	42
Figura 18. Variación estructural de antocianinas dependiendo del pH.....	45
Figura 19. Mecanismos de estabilización de antocianinas aciladas – configuración espacial propuesta y apilamiento de antocianinas aciladas.....	46
Figura 20. Ordenamiento estructural del alginato con iones calcio “Modelo caja de huevos”.....	49
Figura 21. Representación de la reacción de ABTS con persulfato de sodio.....	51
Figura 22. Representación de la reacción del catión radical ABTS <sup>•+</sup> con compuestos fenólicos.....	52
Figura 23. Árbol de Capulí ( <i>Prunus serótina</i> Ehrh var. capulí).....	54
Figura 24. Retención selectiva de polifenoles con Amberlita XAD-7.....	55
Figura 25. Separación de la fracción monomérica y polimérica por CC con Sephadex LH-20.....	56
Figura 26. Equipo HPLC-DAD Waters 2525.....	57
Figura 27. Espectrofotómetro Pharo Merck.....	58
Figura 28. Encapsulamiento del extracto EP.....	61

Figura 29. Variación del color respecto al pH del extracto del fruto de Capulí.....	63
Figura 30. Comparación del contenido antociánico del fruto de Capulí con diferentes frutas.....	66
Figura 31. Recta de calibrado absorbancia vs. concentración de ácido gálico.....	68
Figura 32. Comparación del contenido fenólico en diferentes frutas.....	69
Figura 33. Cromatografía de capa delgada para el extracto ERM.....	70
Figura 34a. Perfil cromatográfico del extracto EP con máximo de absorción a 280 nm.....	70
Figura 34b. Perfil cromatográfico del extracto EP con máximo de absorción a 520 nm.....	71
Figura 35. Espectro de absorción UV-Vis del primer compuesto incoloro presente en el extracto EP.....	72
Figura 36. Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos 2 y 3 presentes en el extracto EP.....	72
Figura 37. Perfil cromatográfico de la primera fracción monomérica aislada por CC con sephadex con máximo de absorción a 280 nm.....	73
Figura 38. Perfil cromatográfico de la segunda fracción aislada por CC con sephadex con máximo de absorción a 280 nm.....	73
Figura 39. Perfiles cromatográficos de la separación de los componentes mayoritarios por HPLC en modo preparativo.....	74
Figura 40. Espectro UV-Vis del pigmento 1 purificado por HPLC-DAD.....	75
Figura 41. Espectro UV-Vis del pigmento 2 purificado por HPLC-DAD.....	76
Figura 42. Perfil cromatográfico HPLC-MS de la primera fracción obtenida por sephadex.....	77
Figura 43. Espectro de masas de la antocianina monomérica 1.....	78
Figura 44. Estructura molecular de la antocianina 1.....	79
Figura 45. Espectro RMN <sup>1</sup> H de la antocianina 1.....	80
Figura 46. Espectro RMN <sup>13</sup> C de la antocianina 1.....	81
Figura 47. Espectro HSQC de la antocianina 1.....	82
Figura 48. Espectro HMBC de la antocianina 1.....	83
Figura 49. Espectro de masas de la antocianina 2 de la segunda fracción obtenida por CC con sephadex.....	85
Figura 50. Estructura molecular de la antocianina 2.....	82
Figura 51. Espectro RMN <sup>1</sup> H de la antocianina 2.....	87
Figura 52. Espectro <sup>13</sup> C de la antocianina 2.....	88
Figura 53. Espectro HSQC de la antocianina 2.....	90
Figura 54. Expansión de la región aromática del espectro HMBC de la antocianina 2.....	91
Figura 55. Expansión de la región alifática del espectro HMBC de la antocianina 2..	92
Figura 56. Espectro COSY de la antocianina 2.....	93

Figura 57. Recta de calibrado para el método TEAC.....	97
Figura 58. Comparación de la capacidad antioxidante TEAC del fruto de Capulí con otros frutos.....	99
Figura 59. Comportamiento cinético del proceso de degradación de soluciones acuosas de EC y EP.....	100
Figura 60. Variación de los tiempos de vida media de los extractos EP y EC con respecto a las diferentes condiciones de almacenamiento.....	103
Figura 61. Resultados obtenidos del almacenamiento del extracto EP encapsulado.	105

## LISTA DE ABREVIATURAS

$A_{440}$	Absorbancia a 440 nm.
ABTS	2,2'-Azinobis-(ethyl-bensothiazoline-6-sulfonic acid Acido 2,2'-azino bis(3-etilbencen-tiazolina-6-sulfónico).
ACN	Acetonitrilo
$A_{\lambda_{vis-m\acute{a}x.}}$	Absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción en la región visible.
BAW	n-butanol/ácido acético glacial/agua
CC	Cromatografía en columna
Cy-3-glu	Cianidina-3-glucósido
EC	Extracto crudo
EP	Extracto rico en polifenoles
ERM	Extracto rico en antocianinas monoméricas
ESI-MS	Espectrometría de masas por ionización electrospray
FD	Factor de dilución
HCOOH	Ácido fórmico
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos.
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas
K	Constante de degradación
RMN- $^1\text{H}$	Resonancia magnética nuclear protónica
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
TEAC	Trolox® equivalent antioxidant capacity, Actividad antioxidante equivalente a trolox
TFA	Ácido trifluoroacético

## RESUMEN

Por medio de la extracción en fase sólida se aisló el extracto crudo de antocianinas del fruto de Capulí (*Prunus serotina* spp. *capuli* (Cav) Mc. Vaug Cav). Se hizo una previa separación del extracto crudo de antocianinas por medio de la cromatografía de exclusión por tamaño, cada fracción de antocianinas monoméricas fue analizada por HPLC y además, posteriormente se purificó por medio de HPLC preparativa. Por medio de la espectrometría de masas-ionización electrospray (EM-IES) y resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR se determinó como pigmentos mayoritarios la cianidina-3-O-(6''-O- $\alpha$ -ramnopiranosil)- $\beta$ -glucopiranosido y cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranosido. La capacidad antioxidante total del extracto crudo (EC) y purificado (EP) se calculó por el método TEAC (capacidad antioxidante equivalente al trolox). El extracto EP mostró mayor capacidad para capturar el radical ABTS, esto puede estar relacionado con el mayor contenido de polifenoles en este extracto producto del enriquecimiento mediante cromatografía en columna (Amberlita XAD-7).

Los resultados del estudio de la degradación de los extractos acuosos de las antocianinas (EC y EP) del fruto de Capulí, en diferentes condiciones de almacenamiento, están de acuerdo con investigaciones previas en las que se demuestra que la degradación de las antocianinas de diversas matrices describen una cinética de reacción de primer orden. Los valores de la constante de velocidad de reacción y el tiempo de vida media evidencian una gran influencia del tipo de extracto, pH, luz y aire sobre la estabilidad de las soluciones acuosas de los extractos de antocianinas. Se muestra claramente que el  $t_{1/2}$  es mayor cuando los extractos (EC y EP) se almacenan en condiciones más ácidas (pH 3.0). De igual forma se puede concluir que en ambos valores de pH las muestras son más estables cuando se almacenan en ausencia de aire (SA) y luz (AL). Además, entre el aire y la luz, el factor que más influye en la degradación de este tipo de extractos es el aire. Estos resultados permiten también concluir que bajo las mejores condiciones de almacenamiento (pH 3 y en ausencia de aire y luz) el extracto purificado (EP) es más estable que el extracto crudo (EC), se deduce entonces que compuestos diferentes a los polifenoles, presentes en el extracto crudo, aceleran los procesos de degradación de las antocianinas.

De otro lado, en este estudio fue posible comprobar que el proceso de encapsular una solución del pigmento con Alginato de sodio favorece significativamente la estabilidad del pigmento ante factores como la luz y el aire, los parámetros cinéticos de degradación son comparables con los de la muestra acuosa almacenada a pH 3 en ausencia de luz y aire (condición más estable).

## ABSTRACT

By means of solid phase extraction was isolated the anthocyanins crude extract present in the fruit of Capulí (*Prunus serotina* spp. *capuli* (Cav) Mc. Vaug Cav). There was a separation the anthocyanins crude extract through size exclusion chromatography, each fraction of monomeric anthocyanins was analyzed by HPLC and also, further, purified by preparative HPLC. With the liquid chromatography coupled to mass spectrometry-electrospray ionization (MS-ESI) and <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C-NMR were determined cyanidin-3-O-(6''-O- $\alpha$ -rhamnopyranosyl)- $\beta$ - glucopyranoside and cyanidin-3-O- $\beta$ -glucopyranoside as the major pigments. Total antioxidant capacity of the crude extract (CE) and purified (PE) was calculated by the method TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity). EP extract showed greater capacity for capturing the ABTS radical, this may be related to the higher content of polyphenols in the extract, product by column chromatography (Amberlite XAD-7).

The results of the study of the degradation of the aqueous extracts of anthocyanin (CE and PE) in the fruit of Capulí, at different storage conditions, are consistent with previous investigations demonstrating that anthocyanins degradation from various matrices describe first order reaction kinetics. The values of the reaction rate constant and the half life time show a strong influence of the type of extract, pH, light, and air on the stability of aqueous solutions of anthocyanin extracts. It is concluded that both pH values in the samples are more stable when stored in the absence of air (AA) and light (AL). In addition, between the air and the light, the most influential factor in the degradation of such extracts is air. These results also conclude that under the best storage conditions (pH 3 and in the absence of air and light) the purified extract (PE) is more stable than the crude extract (CE), it follows that different compounds polyphenols, present in the crude extract, accelerate degradation processes of anthocyanins.

In this study, it was possible to verify that the process of encapsulating a pigment solution with sodium alginate, contributes significantly to the stability of the pigment is exposed to light and air. Degradation kinetic parameters are comparable with those of the sample stored water at pH 3 in the absence of light and air (most stable condition).

## INTRODUCCIÓN

Los colorantes naturales para alimentos son necesarios en la industria, sin embargo, colorantes naturales rojos son escasos ya que pocos extractos naturales tienen un color rojo brillante no mezclado con otros tonos<sup>1</sup>. Como colorantes naturales las antocianinas han ganado gran importancia en alimentos<sup>2</sup>. Este tipo de pigmentos de las plantas son metabolitos de tipo fenólico, pertenecen a la familia de los flavonoides y son responsables de la mayoría de colores rojos y azules de gran variedad de frutas y hortalizas. Una molécula de antocianina está constituida por una aglicona o antocianidina, la cual en su estado natural está glicosidada por uno o más azúcares. Las diferencias en el cuerpo de la aglicona se deben al número de grupos hidroxilo y al grado de metilación de estos grupos.

Además, las antocianinas son potentes antioxidantes<sup>3,4</sup>. El uso de alimentos que contienen antocianinas como parte de la dieta humana puede ser beneficioso para la salud<sup>5,6,7</sup>. Cuando se procesan los alimentos siempre ocurre alguna degradación del color original, el color perdido puede restaurarse usando este tipo de pigmentos naturales<sup>8</sup>. Por otra parte, cuando se le adicionan antocianinas al alimento, estas pueden incrementar su tiempo de vida debido a sus propiedades antioxidantes.

Los colorantes naturales tales como las antocianinas pueden impartir varios tonos rojos al color del alimento, sin embargo, hay limitaciones en su aplicación debido a su solubilidad,

---

<sup>1</sup> FRANCIS, F. Food colorants: anthocyanins. *Cri. Rev. En: Food Sci & Nutr.* Vol., 28 (1989); p. 273-314.

<sup>2</sup> GIUSTI, M.; Wrolstad, R. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *En: Biochem. Eng. J. Vol.*, 14 (2003); p. 217-225.

<sup>3</sup> SAINT-CRICO, N.; Glories, Y.; Vivas, N. Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. *En: Food Res. Int.* Vol., 32 (1999); p. 327-333.

<sup>4</sup> NODA, Y.; Kaneyuki, T.; Mori, A.; Packer, L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyaniding, and pelargonidin. *En: J. Agric. Food Chem.* Vol., 50 (2002); p. 166-171.

<sup>5</sup> MORIMITSU, Y.; Kubota, K.; Tashiro, T.; Hashizume, E.; Kamiyo, T.; Osawa, T. Inhibitory effect of anthocyanins and colored rice on diabetic cataract formation in the rat lenses. *ICS.* 1245 (2002); p. 503-508.

<sup>6</sup> TSADA, T.; Hono, F.; Kitoh, J.; Osawa, T. Protective effects of dietary cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside on liver ischemia-reperfusion injury in rats. *En: Archi. Biochem. Biophys.* Vol., 368 (1999); p. 361-366.

<sup>7</sup> LAZZE, M.; Pizzala, R.; Savio, M.; Stivala, L.A.; Prosperi, E.; Bianchi, L. Anthocyanins protection against DNA damage induced by ter-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells. *En: Mutat. Res.* Vol., 535 (2003); p. 103-115.

<sup>8</sup> FRANCIS, F. Concentrates as colorants. *En: The world of ingredients.* Vol., 3 (1995); p. 26-27.

en la dificultad para igualar el matiz deseado, incompatibilidad con la matriz del alimento y la estabilidad del color con respecto al pH, luz y oxígeno<sup>9,10</sup>. Su color rojo es el resultado neto de todas las antocianinas monoméricas, oligoméricas y poliméricas, junto con sus formas copigmentadas. Se sabe muy bien que las propiedades de las antocianinas incluyendo la expresión del color, están altamente influenciadas por la estructura de la antocianina y por el pH<sup>11</sup>. Generalmente se acepta que las antocianinas muestran su color más intenso cuando están en la forma de ión flavilio<sup>12</sup>. Se ha demostrado que en la región de pH entre 5-7, las antocianinas más simples son inestables y rápidamente pierden color debido a la hidratación de la posición-2 del esqueleto de la antocianidina. La acilación mejora la estabilidad de las antocianinas a través de la copigmentación intramolecular<sup>13</sup>.

En los últimos años se ha incrementado la información con respecto a las características y estabilidad de los extractos de antocianinas de diferentes frutas. En este trabajo se presenta información con respecto al contenido fenólico, actividad antioxidante, estabilidad y caracterización estructural de las antocianinas presentes en el fruto de Capulí.

El Capulí cuyo nombre científico es *Prunus cerotina spp capuli (Cav) Mc. Vaug Cav*) pertenece a la familia de las Rosaceae, así como la ciruela, cereza, melocotón, almendro y muchas otras especies que se hallan distribuidas en diferentes regiones de América Tropical. Su fruto es redondo, con diámetro de 1 cm en promedio, de color verde que se torna morado al llegar a la madurez. Aunque la planta crece en varios países tropicales, ésta es relativamente abundante en Colombia y su fruto es consumido fresco o preparado en forma de jugos o mermelada.

Un trabajo previo sobre antocianinas del fruto de Capulí<sup>14</sup> de México ha establecido la presencia de cianidina-3-rutinosido, cianidina-3-glucosido y un tercer pigmento posiblemente de tipo rutinósido. Nuestro objetivo fue aislar, caracterizar inequívocamente los pigmentos, evaluar la capacidad antioxidante de los extractos y valorar su estabilidad con respecto al pH en presencia y ausencia de luz y aire.

---

<sup>9</sup> MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in food. *En: Anthocyanins as food colors*. P. Markakis (Ed.); Academic Press, New York, (1992); p. 163-181.

<sup>10</sup> BRIDLE, P.; Timberlake, C. F. Anthocyanins as natural food colours- selected aspects. *En: Food Chem*. Vol., 58 (1997); p. 103-109.

<sup>11</sup> CABRITA, L.; Fossen, T.; Andersen, O.M. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *En: Food Chem*. Vol., 68 (2000); p. 101-107.

<sup>12</sup> BROUILLARD, R. The in vivo expression of anthocyanins color in plant. *En: Phytochem*. Vol., 11 (1983); p. 1311-1323.

<sup>13</sup> ESCRIBANO, M. Op. Cit. p. 13.

<sup>14</sup> ORDAZ, A; Wesche-Ebeling, P; Wrolstad, L; Rodriguez, L; Argañiz, A. Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina* Ehrh.) anthocyanins. *En: Journal Food Chemistry*. Vol., 65 (1999) p. 201-206.

## 1. OBJETIVOS:

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar la fracción cruda de polifenoles presentes en el fruto de capulí (*Prunus serótina Ehrh*), y evaluar su actividad biológica *in-vitro* y estabilidad.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar la fracción cruda de polifenoles y purificar los constituyentes mayoritarios que la componen.
- Identificar químicamente los polifenoles mayoritarios mediante la utilización de métodos cromatográficos (TLC, columna, HPLC) y espectroscópicos (UV-Vis, HPLC-MS, RMN).
- Evaluar la actividad biológica (capacidad anti-radical *in vitro*) del extracto crudo de polifenoles y subfracciones purificadas de la especie vegetal.
- Evaluar la estabilidad del extracto crudo de polifenoles frente a factores como pH, luz y aire y valorar como se afecta este parámetro al encapsular el extracto crudo en alginato de sodio.

## 2. MARCO REFERENCIAL

### 2.1 ANTECEDENTES

La oxidación es esencial para muchos organismos vivos en la producción de energía necesaria para diversos procesos biológicos. Especies reactivas de oxígeno (ROS), se producen in vivo durante la oxidación, y aunque, la mayoría de organismos poseen sistemas de reparación y defensa contra este daño oxidativo, estos sistemas son insuficientes para prevenir el daño por completo, provocando gran variedad de enfermedades<sup>15</sup>.

Los flavonoides figuran entre los más numerosos y extendidos productos naturales antioxidantes, que pueden contribuir en la protección contra este daño oxidativo<sup>16</sup>, presentes en gran variedad de frutas y verduras. Flavonoides pigmentados, principalmente antocianinas, son consideradas como las más importantes, debido a su gran actividad antioxidante y sus propiedades fisicoquímicas y biológicas<sup>17</sup>. El consumo elevado de alimentos ricos en antocianinas ha demostrado tener efectos potencialmente benéficos para la salud en diversos trastornos como el cáncer, envejecimiento prematuro, enfermedades neurológicas, hepáticas y cardiovasculares<sup>18</sup>, así como también infecciones bacterianas, inflamaciones, diabetes, disfunción mitocondrial, hipertensión, trastornos de la visión, diarrea, enfermedad de Alzheimer y aterosclerosis<sup>19</sup>. Particularmente, Hassan y Abdel-Aziz (2010) informaron de que el zumo de bayas negras, rico en antocianinas, ayudó a prevenir el estrés oxidativo y reforzar el sistema de defensa antioxidante celular por el aumento de los niveles de sustancias reactivas examinados en órganos de ratas<sup>20</sup>.

---

<sup>15</sup> KOŁODZIEJCZYK, J; Saluk-Juszczak, J; Posmyk, M; Janas K.M., Wachowicz B. Red cabbage anthocyanins may protect blood plasma proteins and lipids. En: Journal of Biology. Vol., 6 (2011); p. 565-574.

<sup>16</sup> DUAN, X; Jiang, Y; Su, X; Zhang, Z; Shi, J. Antioxidant properties of anthocyanins extracted from Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. En: Food Chemistry. Vol., 101, (2007); p.1365–1371.

<sup>17</sup> LI, H; Deng, Z; Zhu, H; Hu, C; Liu, R; Young, J; Tsao, R. Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. En: Food Research International. Vol., 46 (2012); p. 250-259.

<sup>18</sup> PASCUAL, T; Sanchez, M. Anthocyanins: From plant to health Reviews. En: Food Phytochemistry. Vol., 7 (2008); p. 281-299.

<sup>19</sup> DREISEITEL, A; Korte, G; Schreier, P; Oehme, A; Locher, S; Domani, M; Hajak, G; Sand, P. Berry anthocyanins and their glycons inhibit monoamine oxidases A and B. En: Pharmacological Research. Vol., 59 (2009); p. 306-311.

<sup>20</sup> HASSAN, H; Abdel, A. Evaluation of free radical-scavenging and anti-oxidant properties of black berry against fluoride toxicity in rats. En: Food and Chemical Toxicology. Vol., 48 (2010); p. 1999 - 2004.

Resultados recientes de investigaciones realizadas por Fernandez (2013) muestran que las antocianinas aisladas de uva (*Vitis vinifera*) son eficaces antioxidantes tanto a nivel *in vitro* como a nivel *in vivo*, comprobando su efecto sobre la proliferación de diferentes líneas celulares de cáncer en humanos (MKN-28, Caco-2 y MCF-7)<sup>21</sup>.

Colombia es uno de los países con mayor biodiversidad en frutas del mundo, contando con más de 150 ejemplares nativos<sup>22</sup>, por tal razón, se ha incrementado el interés en el análisis y caracterización de los componentes químicos presentes en estas frutas. Contreras y colaboradores (2011) determinaron la capacidad antioxidante (TEAC y FRAP) y contenido fenólico en pulpa, semillas y piel de 24 frutas exóticas provenientes de Colombia, con lo cual, se intensifique el desarrollo científico e industrial hacia nuevos y mejorados productos elaborados con importante valor agregado<sup>23</sup>.

Cerón (2012) desarrolló un novedoso método de extracción de antocianinas provenientes de la mora colombiana (*Rubus glaucus* Benth) usando un proceso de extracción líquida de fluidez mejorada con CO<sub>2</sub> y etanol, que proporciona selectividades más altas, tiempos de extracción más cortos y no utilizan disolventes orgánicos tóxicos<sup>24</sup>, mejorando los rendimientos de hasta el 59,3% en comparación con procesos tradicionales.

Adicionalmente, Osorio y colaboradores determinaron la composición antociánica en frutas de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav., variedad roja) y mora (*Rubus glaucus* Benth.) por medio de las técnicas HPLC-PDA-ESI-MS. A partir de los extractos ricos en antocianina (ARE), fueron obtenidos los compuestos mayoritarios puros por MLCCC (cromatografía contracorriente multicapa) y HPLC preparativa, y sus estructuras inequívocas fueron obtenidos por análisis de RMN 1D y 2D. Una nueva antocianina delfinidina 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosido-3'-O- $\beta$ -D-glucopiranosido, así como cianidina-3-O-rutinósido, pelargonidin-3-O-rutinósido y delfinidina-3-O-rutinósido fueron identificados como constituyentes de tomate de árbol<sup>25</sup>.

---

<sup>21</sup> FERNANDEZ, I; Marques, F; Freitas, V; Mateus, N. Antioxidant and antiproliferative properties of methylated metabolites of anthocyanins. En: Food Chemistry. (May, 2013); <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.033>.

<sup>22</sup> (<http://frudely.spaces.live.com/blog/>).

<sup>23</sup> CONTRERAS, C; Calderon, J; Guerra, H; Garcia, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia En: Food Research International. Vol., 44 (2011); p. 2047-2053.

<sup>24</sup> CERÓN, I; Higuera, J; Cardona, J. Design and analysis of antioxidant compounds from Andes Berry fruits (*Rubus glaucus* Benth) using an enhanced-fluidity liquid extraction process with CO<sub>2</sub> and ethanol. En: Journal of Supercritical Fluids. Vol., 62 (Feb, 2012); p. 96–101.

<sup>25</sup> OSORIO, C; Hurtado, N; Dawid, C; Hofmann, T; Heredia, F; Morales, A. Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits En: Food Chemistry. Vol., 132, (Jun, 2012); p. 1915-1921.

El grupo de Investigación GIPIB (Universidad de Nariño) ha desarrollado estudios en la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* y contenido fenólico en frutas de Motilón (*Hyeronima macrocarpa*)<sup>26</sup>, Mortiño (*Vaccinium floribundum* H.B.K)<sup>27</sup> e Ivilan (*Monima obtusifolia*)<sup>28</sup>, contribuyendo al desarrollo científico e industrial de nuestra región nariñense.

## 2.2 MARCO CONTEXTUAL

Según la clasificación taxonómica realizada en el herbario de la Universidad de Nariño, el fruto de Capulí proviene de un árbol con las siguientes especificaciones: División: Atophyta, Clase: Dicotyledonae, Orden: Rosales, Familia: Rosaceae, Género Prunus. El nombre científico completo es *Prunus serotina* Ehrh subsp. capulí (Cav.) McVaugh (1951) (Código: 45170).

El árbol crece de forma silvestre de 3 a 5 m de altura y tiene un diámetro a la altura del pecho de hasta 1.2 m, produciendo una sombra densa. Su tronco es largo y recto y sus ramas son alternas, erguido-extendidas, lampiñas, escabrosas por la presencia de muchas lenticelas esparcidas. Esta especie se encuentra en Colombia a lo largo de la región andina, a una altura de 2.557 msnm<sup>29</sup>, y está ampliamente distribuida en la región nariñense en municipios de Tumaco, Ipiales y Pasto. Las hojas de este árbol son usadas para fines medicinales como expectorante, estimulante, febrífugo, antiespasmódico, tónico, sedante y para combatir diarreas<sup>30</sup>.

Su fruto es redondo, de color verde que en su madurez adquiere una coloración violeta; su pulpa es verde translúcida similar a la uva, pero contiene una única semilla. El fruto posee un diámetro de 1 cm. en promedio, y pesa alrededor de 1,2 gramos.

---

<sup>26</sup> JIMENEZ, Juan; Villareal, John. Estudio químico de pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del motilón (*Hyeronima macrocarpa*). Trabajo de grado Química, Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Exactas y Matemáticas. Departamento de Química, 2008; 103p.

<sup>27</sup> PORTILLO, Dairo; Villacrés, José. Análisis químico de los pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del mortiño (*Vaccinium floribundum* H.B.K). Trabajo de grado Química, Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Exactas y Matemáticas. Departamento de Química, 2008; 128p.

<sup>28</sup> CHARFUELÁN, Claudia. Análisis químico de los pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del Ivilan (*Monima obtusifolia*). Trabajo de grado Química, Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Exactas y Matemáticas. Departamento de Química, 2012; 112p.

<sup>29</sup> Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 1984.

<sup>30</sup> GUTIERREZ, M.; Camacho, F. Aprovechamiento de plantas medicinales. Instituto de Investigaciones forestales y agrícolas. Colombia (2002) pág. 4-6.

Figura 1. Frutos de Capulí (*Prunus serotina* Ehrh).



Fuente: Esta investigación.

El fruto maduro se consume debido a su agradable sabor y su gran cantidad de color es utilizado como aditivo en recetas culinarias. La abundancia de esta fruta en la región nariñense puede ser una potencial fuente de pigmentos de antocianina para su uso en la industria, debido al incremento en los últimos años de productos más variados, fáciles de preparar, que sean más seguros, nutritivos y económicos.

## 2.3 MARCO TEÓRICO

### 2.3.1 Compuestos Fenólicos en Plantas

Las plantas sintetizan una extensa diversidad de compuestos orgánicos, que son tradicionalmente clasificados como primarios y secundarios. Los metabolitos primarios intervienen en forma directa en el desarrollo fisiológico de la planta, asociados con procesos de fotosíntesis, respiración y crecimiento<sup>31</sup>, entre ellos se encuentran aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, etc.

Los metabolitos secundarios, en cambio, juegan una variedad heterogénea de roles que son atribuidos a productos no esenciales, interviniendo en interacciones entre la planta y su ambiente; ya sea como productos de defensa ante herbívoros y patógenos<sup>32</sup>, soporte mecánico de la planta<sup>33</sup>, atracción de polinizadores o dispersores de semillas, algunos de

---

<sup>31</sup> CROTEAU, R; Kutchan, T; Lewis, L. "Natural Products (Secondary Metabolites)". En: Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Vol., 12 (2000); p. 122.

<sup>32</sup> LINCOLN, T; Zeiger, E. "Secondary Metabolites and Plant Defense". En: Plant Physiology, Vol., 2 (2006); p. 215.

<sup>33</sup> HARBORNE, J; Williams, C. Anthocyanins and other flavonoids, natural products. En: Natural Product Reports. Vol., 15 (1998); p. 631–652.

ellos absorben la radiación ultravioleta, o actúan como agentes alelopáticos (por ejemplo, reducen el crecimiento de plantas competidoras que estén cerca)<sup>34</sup>.

Además de ello, los metabolitos secundarios, han tenido gran interés, debido a las utilidades que en la industria han tenido, puesto que han sido usados como colorantes naturales, fibras, gomas, aceites, ceras, agentes saborizantes, medicamentos y perfumes, y su creciente auge como potenciales medicamentos naturales, antibióticos, insecticidas y herbicidas<sup>35</sup>.

En años recientes, la importancia de estos metabolitos secundarios como constituyentes preventivos dietarios se ha ampliado, conllevando a una mayor investigación en la nutrición humana. A diferencia de las vitaminas tradicionales, estos metabolitos no son esenciales para el bienestar a corto plazo, pero hay una creciente evidencia que el moderado consumo a largo plazo ofrece grandes beneficios a la salud humana, obteniendo impactos favorables en la incidencia de muchas enfermedades crónicas como cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo II que son comunes en la población actual<sup>36</sup>.

Dentro de este amplio rango de metabolitos secundarios presentes en las plantas se encuentran los compuestos fenólicos, los cuales se caracterizan por tener un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilados ligados, los cuales pueden incluir grupos funcionales como ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc. Se han reportado alrededor de 8000 estructuras fenólicas que están extensamente distribuidas a lo largo de todo el reino vegetal<sup>37</sup>, y su concentración dependen de la especie vegetal y su variedad, parte de la planta considerada (hojas, tallos, semillas, frutos), exposición solar, grado de madurez, condiciones de cultivo, procesado y almacenamiento, entre otros.

Las distintas familias de compuestos fenólicos se caracterizan principalmente por el número y disposición de sus átomos de carbono. Comprenden entonces, moléculas simples de bajo peso molecular como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos

---

<sup>34</sup> ZEIGER, E. Secondary Metabolites and Plant Defense. En: Biochemistry of the Plant. Vol., 4 (2006); p. 321-324.

<sup>35</sup> CROZIER, A; Clifford, M; Crozier, A. Secondary Metabolites form fruits and vegetables: measurements and bioavailability. En: Biol. Res. Vol., 33 (200) p. 78-89.

<sup>36</sup> DAVIS, A; Lewis, J; Cai, Y. A polyphenolic pigment from black tea. En: Phytochemistry. Vol., 46 (1997); p. 1397-1402.

<sup>37</sup> HASEGAWA, S; Lam, L; Miller, E. Flavonoids: biochemistry and possible importance in human nutrition. En: Phytochemical and Phytopharmaceuticals. Vol., 2 (2000); p. 95-105.

como taninos y derivados polifenólicos; y son comúnmente encontrados conjugados con azúcares y ácidos orgánicos<sup>38</sup>.

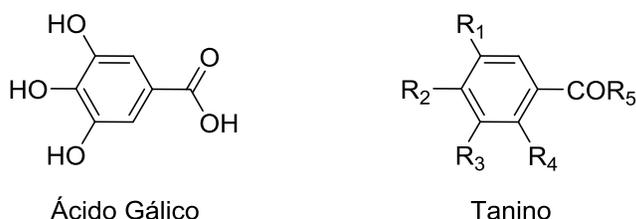
Actualmente este grupo de compuestos presentan un gran interés gracias a su actividad biológica, puesto que muchas de las propiedades beneficiosas descritas en los alimentos de origen vegetal, son asociadas a la presencia de compuestos fenólicos<sup>39</sup>. Estos compuestos pueden ser clasificados como Flavonoides y No flavonoides.

### 2.3.2 NO FLAVONOIDES

Bajo esta denominación encontramos generalmente los ácidos fenólicos (benzoico y cinámico) de gran importancia dietaria, que son precursores de taninos hidrolizables, hidroxicinamatos y sus derivados conjugados, y polifenoles como estilbenos<sup>40</sup>.

2.3.2.1 Taninos Hidrolizables: el principal componente es el ácido gálico (figura 2), que es la subunidad base de taninos hidrolizables presentes en fresas, frambuesas y zarzamoras, y como su nombre sugiere, estos se descomponen fácilmente, liberando ácido gálico, por tratamiento con ácido diluido, mientras que los taninos condensados no lo hacen.

Figura 2. Estructura química de ácido gálico, principal componente de los taninos.



Fuente: PETRIDIS, G. 2011.

Los taninos condensados y taninos hidrolizables son capaces de unirse y precipitar con proteínas de colágeno en la piel de animales. Estos cambios en la piel para convertirla en

<sup>38</sup> HERRMANN, K. On the occurrence of flavonol and flavones glycosides in vegetables. En: Lebensm Unters, Forsch. Vol.,6 (1988); p. 1-5.

<sup>39</sup> DAVIN, L; Lewis, N. Phenylpropanoid metabolism: Biosynthesis of monolignols, lignans and neolignans, lignins and suberins. En: Phenolic Metabolism in Plants, H. A. Stafford, R. K. Ibrahim. New York (1992); p. 325-375.

<sup>40</sup> HELGT, H; Heldt, F. Plant Biochemistry. En: Elsevier Academic Press Amsterdam. Vol., 12 (2005); p. 12-18.

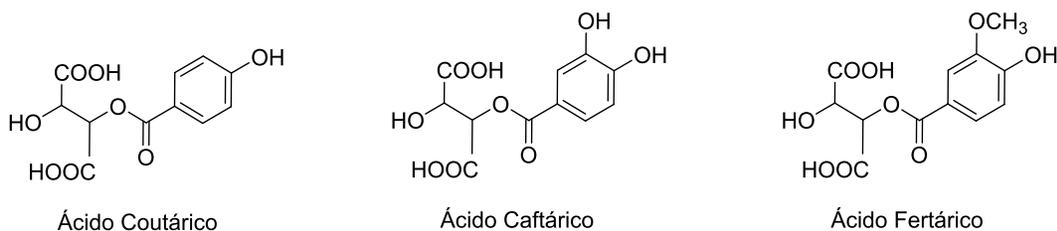
cuero, la hace resistente a la putrefacción. Los taninos derivados de plantas han, por lo tanto, formado la base de la industria del curtido durante muchos años<sup>41</sup>.

Los taninos, además, se unen a las proteínas salivales, produciendo un sabor que es reconocido como astringente por la lengua humana. La leve astringencia mejora el sabor y la textura de un gran número de alimentos y bebidas, en particular el té y vinos tintos. Clifford (2000) expresó la concentración de ácido gálico en la uva, siendo de 65-165 mg/L en vinos tintos<sup>42</sup>.

Muchas frutas no maduras tienen un alto contenido de taninos, que están típicamente concentrados en la corteza, lo cual ha podido ser un evolucionario beneficio, que retrasa el consumo de frutas antes de que las semillas sean capaces de germinar<sup>43</sup>.

2.3.2.2 Hidroxicinamatos: también llamados fenilpropanoides, tienen una estructura general C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, es decir, contienen tres átomos de carbono unidos a un fenol. Los más importantes hidroxicinamatos son el ácido p-cumárico, caféico y ferúlico que a menudo se acumulan en sus respectivos ésteres tartrato, ácidos coutárico, caftárico y fertárico (figura 3) en diversas frutas<sup>44</sup>.

Figura 3. Estructura química de hidroxicinamatos más comunes.



Fuente: CLIFFORD, M. 2000.

Otros ejemplos de hidroxicinamatos incluyen hidroxycumarinas, fenilpropanos y lignanos.

<sup>41</sup> PETRIDIS, G. Tannins: types, foods containing, and nutrition. Hauppauge, N.Y.: Nova Science Publishers; Available from: eBook Academic Collection (EBSCOhost), Ipswich, MA. (2011).

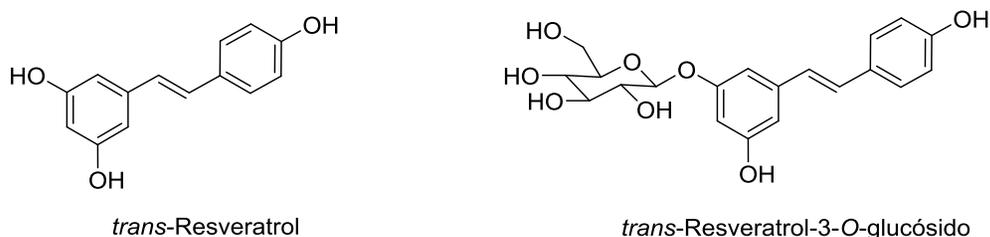
<sup>42</sup> CLIFFORD, M. Miscellaneous phenols in foods and beverages – nature, occurrence and dietary burden. En: *J. Sci. Food Agric.* Vol., 80 (2000); p. 1126-1137.

<sup>43</sup> HASHIMOTO, F; Nonaka, G; Nishioka, A. Tannins and related compounds LVI. Isolation of four new acylated flavan-3-ols from oolong tea. En: *Chem. Pharm. Bull.* Vol., 34 (1988); p. 61-65.

<sup>44</sup> REBOLLO, S. Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos. Tesis doctorado en ciencias químicas, España: Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de ciencias. Departamento de química analítica, nutrición y bromatología (2007) p. 201.

2.3.2.3 Estilbenos: tienen un esqueleto básico de 14 carbonos (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>), a esta familia de compuestos fenólicos pertenecen las fitoalexinas, sustancias sintetizadas por las plantas en respuesta a ataques de hongos, bacterias y virus patógenos, encontrándose en niveles muy variados según el grado de inducción de la infección. El resveratrol es el más común estilbeno<sup>45</sup>, se encuentra presente en la uva, bajo su forma *trans* y de su derivado glicosilado (Figura 4).

Figura 4. Estructura química del estilbeno más común, *trans*-Resveratrol y su derivado glicosilado.



Fuente: PETRIDIS, G. 2011.

Según estudios realizados al *trans*-resveratrol, se ha demostrado que inhibe enfermedades cardiovasculares y la oxidación de LDL, que es la etapa inicial de la aterosclerosis<sup>46</sup>.

### 2.3.3 FLAVONOIDES.

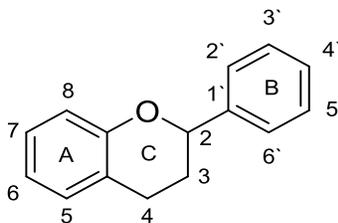
Los flavonoides son compuestos fenólicos de quince carbonos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), que consta de dos anillos aromáticos A y B conectados a través de tres carbonos que usualmente forman un heterociclo de oxígeno denominado C (Figura 5) que corresponde a la estructura 2-fenil-benzopirilio<sup>47</sup>.

<sup>45</sup> CLIFFORD, M. Anthocyanins and other polyphenols - nature, occurrence and dietary burden. *En: J. Sci. Food Agric. Vol.*, 80 (2000); p. 1063-1072.

<sup>46</sup> DEWICK, P. Medicinal natural products: The shikimate pathway, aromatic amino acids and phenylpropanoids. *En: John Wiley. Vol. 2* (2002); p. 121-164.

<sup>47</sup> SHIRLEY, B. Flavonoide biosynthesis: New functions for an old pathway. *En: Trends Plant Sci. Vol.*, 1 (1996); p. 377-382.

Figura 5. Estructura básica de la mayoría de flavonoides (2-fenil-benzopirilio).



Fuente: DEWICK, G. 2002.

La estructura de los flavonoides  $C_6-C_3-C_6$ , es el producto de dos rutas de biosíntesis separadas. El anillo aromático B junto a los tres carbonos constituye a la unidad sintetizada de fenilpropanoide a partir de *p*-cumaril-CoA. Los seis carbonos del anillo A son obtenidos de la condensación de tres unidades de acetato por la ruta del ácido malónico<sup>48</sup>.

La fusión de estas dos partes involucra la condensación paso a paso de *p*-cumaril-CoA con tres residuos de malonil-CoA, cada uno donando dos átomos de carbono, en una reacción catalizada por la enzima chalcona sintasa (CHS), el producto de esta reacción es naringenina chalcona (figura 6). El próximo paso es la conversión estereoespecífica de la naringenina chalcona a naringenina (flavanona) por la enzima chalcona isomerasa (CHI), que es un intermediario central en la formación biosintética de flavonoides.

Como un resultado de la hidroxilación en C3, que es catalizada por la flavanona-3-hidroxilasa, las flavanonas son convertidas a dihidroflavonoles con la conversión de naringenina a dihidrocamferol. Finalmente, las leucoantocinidinas son intermediarios en la formación de flavan-3-ol, proantocianidinas y antocianinas. La enzima leucocianidin deoxigenasa (LDOX) cataliza la síntesis a cianidina<sup>49</sup> (figura 6).

La estructura base de un flavonoide, puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que, los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos de composición y concentración muy variable, que pueden modificarse en respuesta al ambiente en que se encuentre expuesta la planta.

<sup>48</sup> HOLTON, T; Cornish, E. Genetics and biochemistry of polyphenols biosynthesis. En: Plant Cell. Vol., 7 (1995); p. 1071-1083.

<sup>49</sup> DIXON, R; Steele, C. Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. En: Trends Plant Sci. Vol., 4 (1999); p. 394-401.

Los flavonoides se dividen a su vez en flavonas, flavonoles, flavan-3-ol, flavanonas y antocianinas<sup>50</sup>. Otro grupo de flavonoides, que cuantitativamente son componentes minoritarios, son los dihidroflavonoles, flavan-3,4-dioles, cumarinas, chalconas, dihidrochalconas y auronas; debido a ellos. Por ello, los flavonoides son los polifenoles más comunes y ampliamente distribuidos en las plantas, están presentes en alta concentración en hojas y piel de frutos, y tienen variadas e importantes funciones como metabolitos secundarios. En plantas, los flavonoides están involucrados en diversos procesos como protección UV, pigmentación<sup>51</sup>, defensa de patógenos, atracción de polinizadores, resistencia a enfermedades, estimulación de los nódulos fijadores de nitrógeno, etc<sup>52</sup>.

Además, se les ha atribuido actividad como antioxidantes para la inhibición de productos radicalarios, que depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de su estructura química<sup>53</sup>.

Estudios epidemiológicos indican que están asociados con el bajo riesgo de padecer enfermedades degenerativas de tipo cardiovascular y cáncer<sup>54</sup> e interviniendo en propiedades de aumento de la permeabilidad de los capilares sanguíneos, y ejercen acción sobre el sistema vascular por sus efectos vasodilatadores (hialuronidasa, catecol-O-metiltransferasa, fosfodiesterasa-AMPC, PKC, etc)<sup>55</sup>. Además, presentan actividad antiagregante plaquetaria, bactericidas, antiinflamatoria, antifúngicos y captadora de radicales libres<sup>56</sup> atribuida a la facilidad de ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre.

---

<sup>50</sup> TSUDA, T; Watanabe, M; Ohshima, K; Norinobu, S; Choi, S. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyaniding 3-O-beta-d-glucoside and cyanidin. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry Vol., 42 (1994); p. 2407–2410.

<sup>51</sup> DELGADO, F; Jimenez, A; Paredes, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. En: Food Sci Nutr. Vol., 40 (2000); p. 173-289.

<sup>52</sup> GHISELLI, A; Nardini, M; Baldi, A; Scaccini, C. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol., 46 (1998); p. 361–367.

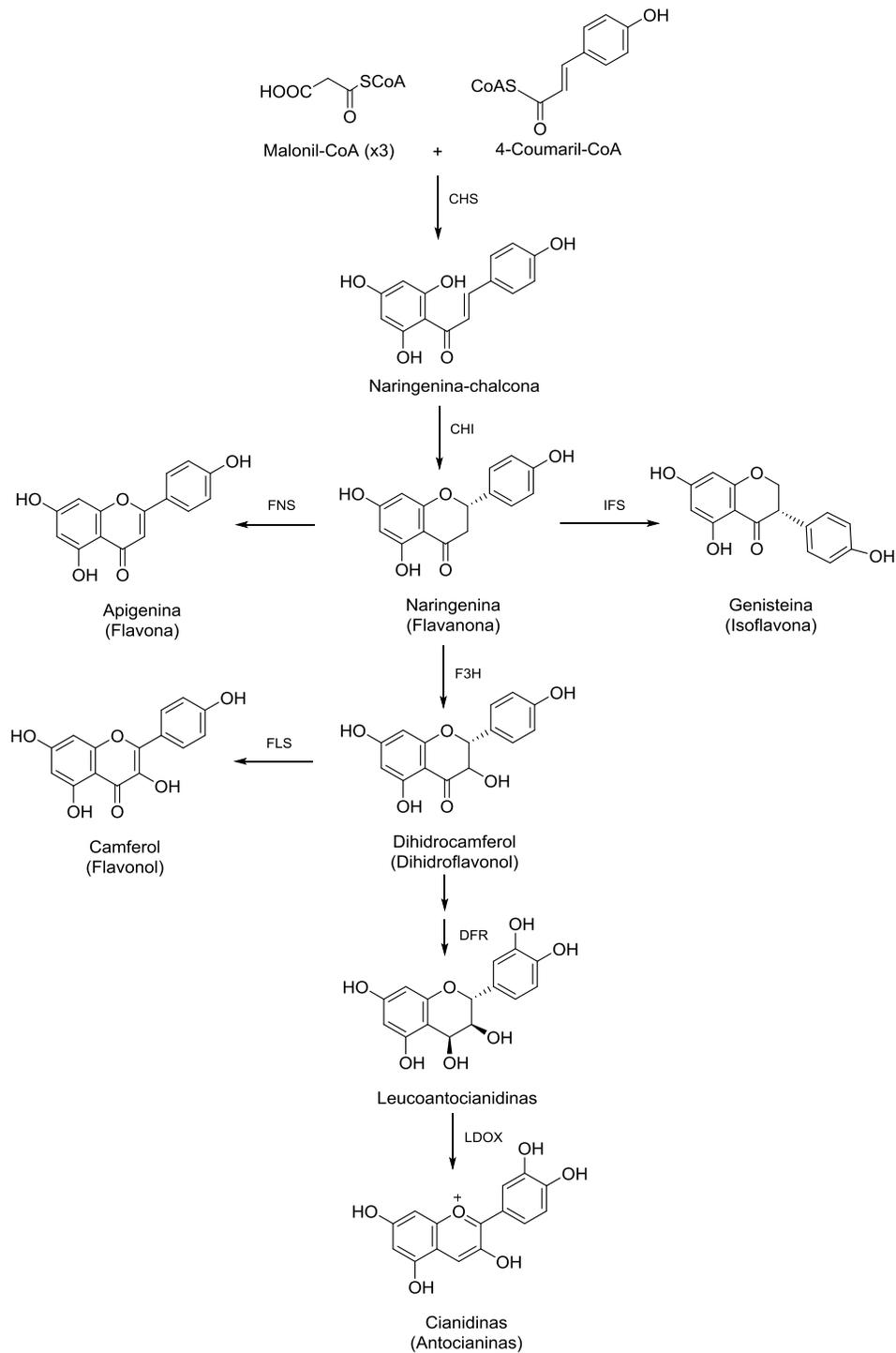
<sup>53</sup> GARCIA, A; Rimbach, G; Rivas, G. Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins A - studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. En: J. Agric. Food Chem. Vol., 52 (2004); p. 3378–3384.

<sup>54</sup> KAMEI, H; Kojima, T; Hasegawa, M; Koide, T; Umeda, T; Yukawa, T. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. En: Cancer Investigation. Vol., 13 (1995); p. 590–594.

<sup>55</sup> KAUFMAN, M; Cseke, L. Natural Products from plants. Crc Press. United States of America. (1998); p. 65-67.

<sup>56</sup> MARTINEZ, J; Gonzales, J. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. En: Nutr. Hosp. Vol., XVII (2002); p. 271 – 278.

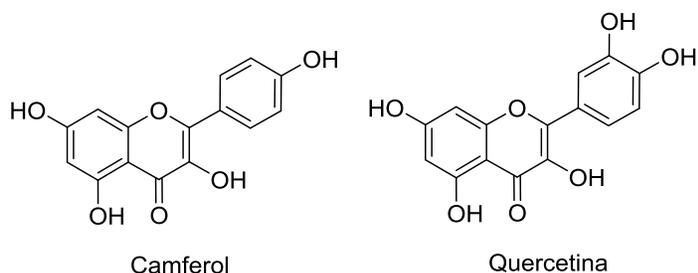
Figura 6. Esquema de la ruta biosintética de principales flavonoides.



Fuente: DEWICK, G. 2002.

2.3.3.1 Flavonoles: los flavonoles son posiblemente la familia más amplia de los flavonoides distribuidos en gran variedad de plantas. Flavonoles como la miricetina, quercetina y camferol (figura 7) son los más comunes encontrados como *o*-glicósidos. La conjugación ocurre más frecuentemente en la posición 3 del anillo C pero sustituciones pueden también ocurrir en las posiciones 5, 7, 4', 3' y 5' de los anillos<sup>57</sup>. Aunque el número de agliconas es limitado, son flavonoles conjugados muy numerosos con más de 200 diferentes azúcares conjugados sólo de camferol.

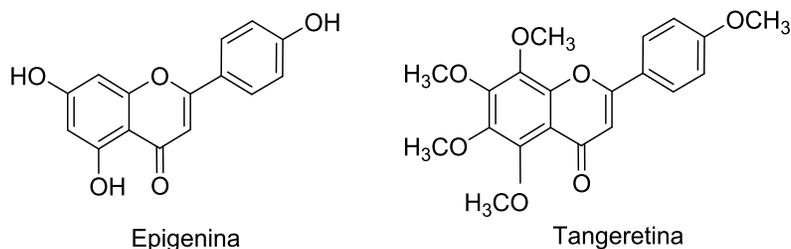
Figura 7. Estructuras químicas de flavonoles de camferol y quercetina,



Fuente: DEWICK, G. 2002.

2.3.3.2 Flavonas: las flavonas tienen una estructura similar a los flavonoles, a excepción de un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C (figura 8).

Figura 8. Estructuras químicas de flavonas de epigenina y tangeretina.



Fuente: MARTINEZ, J. 2002.

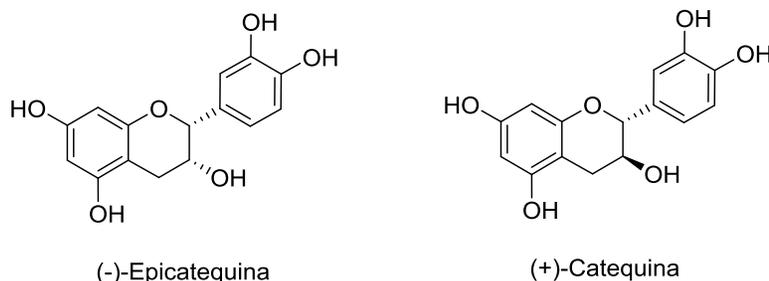
Un amplio rango de sustituciones es también posible con las flavonas, incluyendo hidroxilación, metilación y glicosilación. A diferencia de los flavonoles, las flavonas no están distribuidas ampliamente, con ocurrencias significativas en apio, perejil y algunas

<sup>57</sup> CRESPY, V; Morand, C. The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. En: J. Physiol. Vol., 284 (2003); p. 980-988.

hierbas, y adicionalmente, flavonas polimetoxiladas como tangeretina (figura 7) han sido encontradas en especies cítricas<sup>58</sup>.

2.3.3.3 Flavan-3-ol: los flavan-3-ol son la división más compleja de flavonoides en un rango de monómeros simples como la (+)-catequina y su isómero (-)-epicatequina (figura 9), a proantocianidinas oligoméricas y poliméricas, también conocidos como taninos condensados<sup>59</sup>. A diferencia, de los demás flavonoides, los flavan-3-ol tienen un carbono saturado en la posición 3 del anillo C y son moléculas no planares. Los dos centros quirales en C2 y C3 de los flavanoles producen cuatro isómeros por cada grado de hidroxilación del anillo B, dos de cada (+)-catequina y (-)-epicatequina encontrándose en la naturaleza, mientras que es comparativamente raro encontrar (-)-catequina y (+)-epicatequina<sup>60</sup>.

Figura 9. Estructuras de flavan-3-ol más comunes.



Fuente: MARTINEZ, J. 2002.

Aunque estas diferencias en quiralidad de la estructura en 3D no tienen un efecto significativo en sus propiedades redox o en la habilidad para unirse sin restricciones a radicales, esto puede tener un efecto más marcado en las propiedades de enlace con el concepto de “cerradura y llave”, ya sea en interacciones entre enzima-sustrato, enzima-inhibidor o receptor-ligando. De acuerdo con Yoshida (1994)<sup>61</sup>, es interesante notar que personas alimentadas con (-)-epicatequina excretaban (+)-epicatequina, indicando una apertura en el anillo y racemización, posiblemente en el tracto gastrointestinal.

<sup>58</sup> DAY, A; Williamson, G. Biomarker for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *En: Br. J. Nutr. Vol., 86 (2001); p. 105-110.*

<sup>59</sup> LIN, J; Liang, Y. Survey of catechins, gallic acid and methylxanthines in green, oolong, pu’erh and black teas. *En: J. Agric. Food Chem. Vol., 46 (1998); p. 3635-3642.*

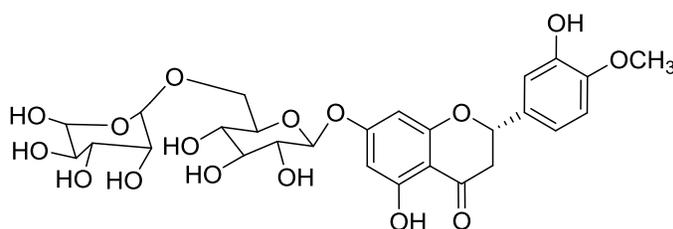
<sup>60</sup> FELGINES, C; Talavera, S; Gonthier, M. Strawberry Anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *En: J. Nutri. Vol., 133 (2003); p. 1296-1301.*

<sup>61</sup> YOSHIDA, T; Nakazawa, T. Tannins from theaceous plants: A dimeric hydrolysable tannins from *Camellia oleifera*. *En: Phytochemistry. Vol., 37 (1994); p. 241-244.*

Las proantocianidinas oligoméricas y poliméricas que consisten exclusivamente de (-)-epicatequina, se encuentran en gran abundancia en plantas y frutos, ya sea en la piel y semillas de uvas negras, semillas de cacao<sup>62</sup> y hojas de té verde y negro<sup>63</sup>. Estas proantocianidinas pueden formar polímeros de hasta 50 unidades.

2.3.3.4 Flavanonas: las flavanonas son caracterizadas por la ausencia de un doble enlace de los carbonos 2 y 3 del anillo C y la presencia de un centro quiral en el carbono 2. Las flavanonas son altamente reactivas y ha sido reportados reacciones de hidroxilación, glicosilación y O-metilación<sup>64</sup>.

Figura 10. Estructura química de flavanonas más comunes.



Hesperidina

Fuente: MARTINEZ, J. 2002.

La más común flavanona glicosilada es hesperetina-7-O-rutinosido (hesperidina, figura 10) encontrada en la piel de varias frutas cítricas<sup>65</sup>.

2.3.3.5 Antocianidinas: las antocianidinas son ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Son derivados del catión 2-fenil-benzopirilio, la carga positiva se encuentra deslocalizada entre diversos átomos de la molécula, aceptándose como posibles, diversas estructuras de tipo oxonio-carbonio<sup>66</sup>. Los iones oxónio son generalmente poco estables, pero en el caso del fenil, los dobles enlaces conjugados que posee le confieren estabilidad.

<sup>62</sup> GARCIA, E., Cabello, F., & Revilla, E. Analysis of grape and wine of Anthocyanins and catequin by HPLC-MS. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry Vol.*, 51 (2003); p. 5622-5629.

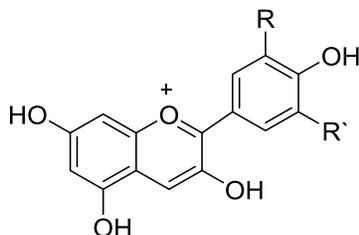
<sup>63</sup> LIN, J. et. al. *Op. Cit.* p. 26.

<sup>64</sup> MIURA, K; Kikuzaki, H. Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) measured by the oil stability index method. *En: J. Agric. Food Chem. Vol.*, 50 (2002); p. 1845-1851.

<sup>65</sup> PAGANGA, G; Miller, N; Rice, C. The phenolic content of fruits and vegetables and their antioxidant activities. *En: FEBS Lett. Vol.*, 401 (1999) p. 78-82.

<sup>66</sup> KONGA, J; Chia L.; Goha, N. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Journal Phytochemistry* 64, 923-933 (2003).

Figura 11. Estructura general de una antocianidina.



Fuente: DEWICK, G. 2002.

Esta estructura base se denomina aglicona o antocianidina de quince carbonos ( $C_6-C_3-C_6$ ) (figura 11). En la naturaleza se conocen alrededor de 17 antocianidinas<sup>67</sup> las cuales figuran en la tabla 1.

Tabla 1. Antocianidinas más comunes presentes en la naturaleza.

Nombre	Abreviación	Sustitución							Color
		3	5	6	7	3'	4'	5'	
Apigeninidina	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	Naranja
Aurantidinina	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	Naranja
Capensinidina	Cp	OH	O	H	OH	O	OH	O	Rojo azulado
Cianidina	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Naranja-Rojo
Delfinidina	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Rojo azulado
Europinidina	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Rojo azulado
Hirsutidina	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Rojo azulado
6-Hidroxicianidina	6OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	Rojo
Luteolinidina	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H	Naranja
Malvidina	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Rojo azulado
5-Metilcianidina	5-MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	Naranja-Rojo
Pelargonidina	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Naranja
Peonidina	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Naranja-Rojo
Petunidina	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Rojo azulado
Pulchellidina	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Rojo azulado
Rosinidina	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Rojo
Trisetinidina	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Rojo

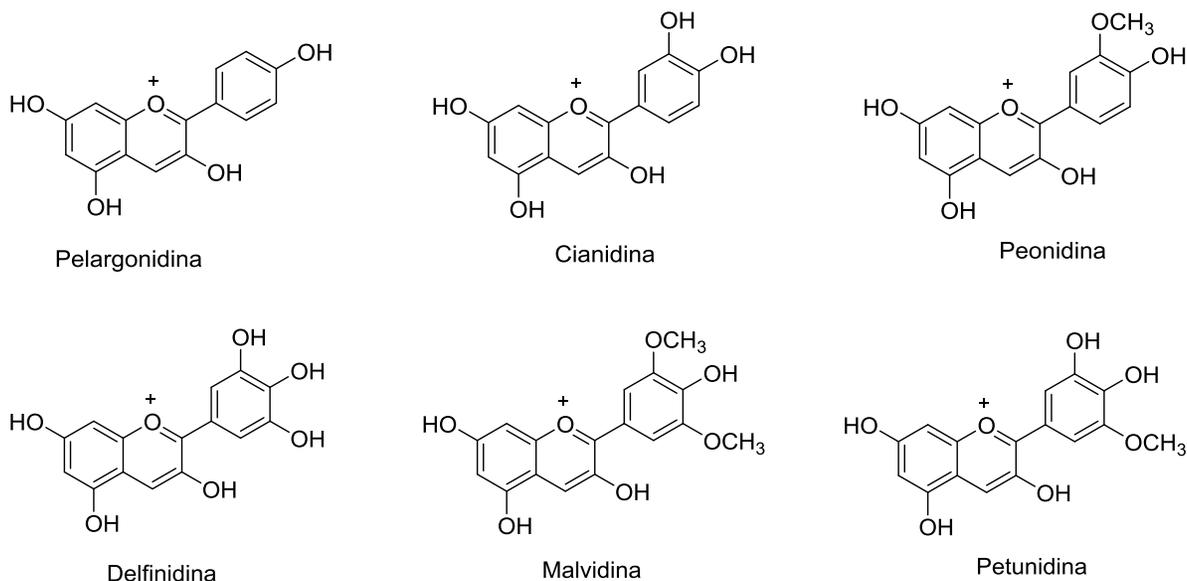
Fuente: DELGADO, F. 2000.

Sólo 6 son antocianidinas importantes presentes en frutas y vegetales, cada una de ellas genera una intensidad de rojo diferente y se encuentra constituyendo diferentes partes de

<sup>67</sup> DELGADO, F. Op. Cit. p. 24

la planta: cianidina (50%), pelargonidina (12%), peonidina (12%), delphinidina (12%), petunidina (7%), y malvidina (7%)<sup>68</sup>.

Figura 12. Estructura química de antocianidinas más comunes.



Fuente: DEWICK, G. 2002.

En la naturaleza, estas agliconas presentan una o más moléculas de azúcar y grupos acil, adheridas en diferentes posiciones hidroxiladas a la estructura básica, que les confiere una infinidad de posibles combinaciones<sup>69</sup>, lo que, junto con la interacción con otras moléculas, hace que la gama de colores que se derivan de estas sustancias sea enorme, denominándose Antocianinas.

#### 2.3.4 ANTOCIANINAS.

Las antocianinas son los pigmentos hidrosolubles más importantes dentro de esta familia de flavonoides, siendo particularmente importantes por su amplia gama de colores rojo, azul y violeta en frutos, flores, hojas, tallos y raíces de gran variedad de plantas distribuidos específicamente<sup>70</sup>; muy útiles, ya sea como marcadores quimio-taxonómicos

<sup>68</sup> GIUSTI, M. Op. Cit. p. 12.

<sup>69</sup> FRANCIS, F. Op. Cit. p. 12.

<sup>70</sup> ESCRIBANO, M. Op. Cit. p. 13.

en la bioquímica de la planta<sup>71</sup> ; o como un índice del control y aseguramiento de la calidad de productos vegetales y frutales<sup>72</sup>.

En la planta, estos compuestos se acumulan en vacuolas y antocianoplastos de las células vegetales. Actúan como coadyuvante tanto en la atracción de insectos y animales para la polinización como también en la dispersión de semillas<sup>73</sup>, lo cual se debe a sus llamativos colores de las flores en las angiospermas, y por tanto, son de considerable valor en la co-evolución de estas interacciones planta-animal; aunque también puede actuar como inhibidores en el crecimiento de ciertas larvas de insectos herbívoros<sup>74</sup> como estrategia de defensa, lo cual ha sido evidenciado, por ejemplo, con la cianidina-3- $\beta$ -glucósido en flores de algodón o petunia que actúa como defensa contra larvas del gusano del tabaco *Heliothis virescens*<sup>75</sup>.

Específicamente estos compuestos son los que han innovado la industria del color, junto a la gran demanda de los consumidores por colorantes alimentarios naturales<sup>76</sup>; además de que se les ha atribuido efectos benéficos significativos a la salud, que hace que se implanten nuevas iniciativas de investigación orientadas al desarrollo eficiente de estos recursos fitoquímicos valiosos.

Su gran potencial se debe a la conformación estructural que presentan estos compuestos capaz de capturar radicales libres, exaltando su importancia a nivel metabólico y protegiendo de enfermedades como cáncer, trombosis, alergias, inflamaciones, además de que beneficia en la disminución del colesterol y protección del hígado y el estómago.

Estudios demuestran que las antocianinas tienen una actividad anticancerígena en células con diferentes funciones, en estudios tanto in vitro como de otros tipos de tumores in vivo<sup>77</sup>. El potencial de prevención de las antocianinas revelado de estudios in vitro incluyen captación de radicales libres, reducción de la metástasis e inflamación, inducción

---

<sup>71</sup> GALVANO, F; La Fauci, L; Lazzarino, G. Cyanidins: metabolism and biological properties. En: Journal Nutr Biochem. Vol., 15 (2004); p. 2-11.

<sup>72</sup> DEWICK, P. Op. Cit. p. 23.

<sup>73</sup> HOFFMANN, C; Harborne, J; McCaffery, A. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts anthocyanins and rutin on *Trichoplusia ni* growth. En: Entomol. Exp. Vol., 98 (2001); p. 181-194.

<sup>74</sup> HWANG, Y; Wu, K; Kumamoto, J; Axelrod, H; Mulla, M. Isolation and identification of mosquito repellents in *Artemisia vulgaris*. En: J. Chem. Ecol. Vol., 11 (1985); p. 1297-1306.

<sup>75</sup> HEDIN, P; Jenkins, J; Collum, D; White, W; Parrott, W; MacGown, M. Cyanidin-3- $\beta$ -glucoside, a newly recognized basis for resistance in cotton to the tobacco budworm *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). En: Experientia. Vol., 39 (1983); p. 799-801.

<sup>76</sup> KAPADIA, G; Tokuda, H; Sridhar, R. Cancer chemopreventive activity of synthetic colorants used in foods, pharmaceuticals and cosmetic preparations. En: Cancer Letters. Vol.,129 (1998), p. 87-95.

<sup>77</sup> WATKINS, T. Wine: Nutritional and Therapeutic Benefits. ACS Symposium Series 661. En: American Chemical Society, Washington, DC, USA. (1997); p. 321.

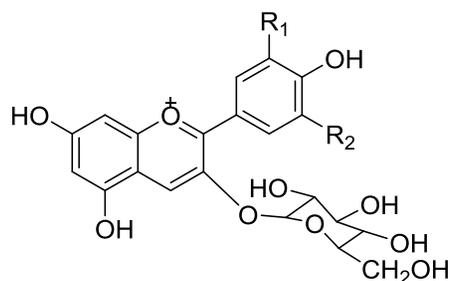
de apoptosis y diferenciación, debido a que las antocianinas modulan la expresión y activación de múltiples genes asociados con estas funciones celulares<sup>78</sup>. Estudios in vivo, demuestran que una dieta rica en antocianinas inhibe el cáncer del tracto gastrointestinal y aplicadas tópicamente, estas antocianinas inhibe el cáncer de piel, ya que en estas zonas del cuerpo humano es absorbido directamente en el metabolismo<sup>79</sup>.

#### 2.3.4.1 Estructura Química

La estructura de las antocianinas es la de un híbrido de resonancia, en la que la carga positiva se encuentra deslocalizada entre diversos átomos de la molécula, aceptándose como posibles diversas estructuras (figura 13)<sup>80</sup>.

Las antocianinas están conformadas por una estructura base denominada aglicona o antocianidina, a la cual se unen diferentes glicósidos y ácidos orgánicos. La diferencia de color de las antocianinas se debe al número de grupos hidroxilo, la naturaleza y número de glicósidos unidas a la aglicona, la posición de esta fijación, y la naturaleza y número de grupos acilo alifáticos y aromáticos, unidos a los glucósidos en la molécula de antocianina<sup>81</sup>.

Figura 13. Estructura general de una antocianina.



Fuente: DEWICK, G. 2002.

<sup>78</sup> WU, X; Prior, R. Systematic identification and characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. En: J. Agric. Food Chem, Vol., 53 (2005); p. 2589-2599.

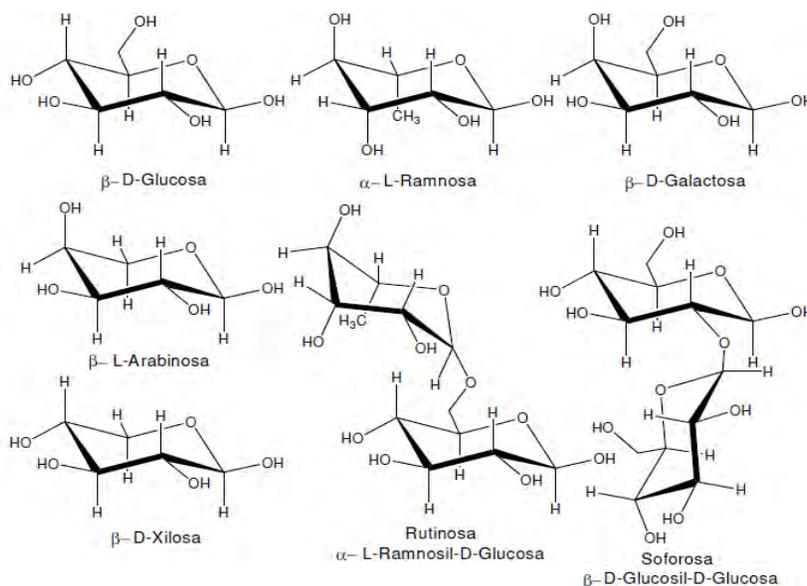
<sup>79</sup> KUSKOSKI, M; Asuero, A. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. En: Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas. Vol., 25 (2005); p. 726-732.

<sup>80</sup> WANG, M; Simon, J. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus*). En: J. Agric. Food Chem. Vol., 51 (2003); p. 601-608.

<sup>81</sup> ANDERSON, O; Francis, G. Thechniques of pigment identification. En: Plant pigments and their manipulation. Davies K. Ed: Blackwell Publishing: London (2004); p. 293-341.

Diferentes glicósidos se unen covalentemente a la antocianidina por medio de un enlace  $\beta$ -glicósido con el oxígeno del grupo hidroxilo en la posición 3 dándole una mayor estabilidad y solubilidad<sup>82</sup>, también existen glicosidación en las posiciones 5, 7, 3', 5'. Los azúcares más comunes son ramnosa, galactosa, xilosa, arabinosa y en su mayor proporción glucosa (Figura 14).

Figura 14. Estructura de azúcares más comunes en antocianinas.



Fuente: DEWICK, G. 2002.

La glicosidación de tres antocianidinas no-metiladas (cianidina, delfinidina y pelargonidina) son las que más se encuentran presentes en la naturaleza, llegando a estar en un 80% en hojas pigmentadas, 69% en frutos y 50% en flores<sup>83</sup>.

Los glicósidos pueden tener enlazados grupos acilo alifáticos y aromáticos proporcionándole mayor estabilidad a la antocianina, lo cual mejora si el grupo acilo enlazado al glicósido es aromático<sup>84</sup>. Los grupos acilo aromático más comunes encontrados incluyen ácidos hidroxicinámicos, p-cumárico, cafeíco, ferúlico, sinápico, p-hidroxibenzoico. Dentro de los ácidos alifáticos están el ácido malónico, acético, málico,

<sup>82</sup> REIN, M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins, University of Helsinki, Department of applied chemistry and microbiology food chemistry division, Finlandia (2005); p. 423.

<sup>83</sup> RODRIGUEZ, L.; Giusti, M.; Wrolstad, R. Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems. *En: Journal of Food Science*. Vol., 64 (1999); p. 451-456.

<sup>84</sup> TORSKANGERPOLL, K; Chou, E; Andersen, M. Separation of acylated anthocyanin pigments by high speed CCC. *En: Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. Vol., 24 (2001); p. 1791-1799.

succínico y oxálico; generalmente sustituidos en la posición C-3 que les confiere estabilidad, protegiendo aún más al ion flavilio del ataque de factores externos que puedan degradarlo<sup>85</sup>. En el caso de antocianinas mono-aciladas sólo el lado del anillo pirilio puede ser protegido contra el ataque nucleofílico del agua y así podría ocurrir un efecto intermolecular débil. Para evitar esto, en ocasiones existe una copigmentación con otras antocianinas di-aciladas, produciendo una estructura tridimensional tipo sanduche de apilamiento aromático con interacciones hidrofílicas de los grupos hidroxilo del anillo aromático y la carga positiva del núcleo pirilio, disminuyendo la formación de pseudobases<sup>86</sup>.

#### 2.3.4.2 MÉTODO DE EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN.

La extracción con solventes es el método más comúnmente realizado para aislar las antocianinas presentes en el material vegetal. Para ello, el solvente más usado es metanol, se ha encontrado que a partir de piel de uva, la extracción con metanol es 20% más eficaz que con etanol, y 73% más eficaz que sólo agua<sup>87</sup>. Este procedimiento se realiza a pH ácido con el fin de aumentar la polaridad y obtener antocianinas en forma de catión flavilio, impidiendo la degradación, adicionando pequeñas cantidades de ácido, ya sean ácidos orgánicos o inorgánicos.

Sin embargo, los ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico se concentra durante la evaporación de metanol produciendo la degradación del pigmento. En un estudio realizado en uvas rojas, donde comparaban diferentes técnicas de extracción, se demostró que cantidades de hasta 0.12 mol/L de ácido clorhídrico puede causar hidrólisis parcial de los antocianos acilados<sup>88</sup>. Por este motivo, la extracción de antocianinas se realiza preferiblemente con ácidos orgánicos como ácido acético, ácido fórmico, ácido trifluoroacético, entre otros.

La extracción con solventes implica además, la co-extracción de compuestos no fenólicos tales como azúcares, ácidos orgánicos y proteínas, requiriendo procesos posteriores de purificación con técnicas de extracción en fase sólida y en fase líquida, que incluyen técnicas cromatográficas tales como cromatografía de papel (CP), cromatografía de capa delgada (CCD) y cromatografía en columna (CC) utilizando resinas como

---

<sup>85</sup> REIN, M. Op. Cit. p. 34.

<sup>86</sup> RODRIGUEZ, L. Op. Cit. p. 30.

<sup>87</sup> TURKER, N; Erdogdu, F. Effects of pH and temperature of extraction medium of effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot. En: Journal of Food Engineering. Vol., 76 (2006); p. 579-583.

<sup>88</sup> REVILLA, E; Ryan, J. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol., 46 (1998); p. 4592-4597.

polivinilpirrolidina (PVP), Sephadex LH-20, Amberlita XAD-7 y resinas de intercambio iónico<sup>89</sup>. La Amberlita XAD-7, es generalmente utilizada para la purificación inicial del extracto crudo de polifenoles, los cuales se ligan fuertemente a estos adsorbentes a través de los grupos hidroxilo de su estructura y son posteriormente separados mediante el uso de una serie de disolventes de mayor polaridad<sup>90</sup>.

Para purificar y aislar las fracciones obtenidas de antocianinas y otros polifenoles, la técnica más usada es la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de tipo analítica y preparativa, usada debido a la alta solubilidad en agua, naturaleza no volátil y térmicamente lábiles característica de las antocianinas, y porque permite separar, identificar y cuantificar. Para obtener resultados óptimos, en este tipo de procedimientos es necesario optimizar la polaridad de los eluyentes. La mejor separación se usa en fase reversa (RP-HPLC) ya que permite realizar excelentes separaciones en tiempos cortos de análisis<sup>91</sup>. Al combinarse con un detector de arreglo de diodos ó un detector electroquímico, proporciona alguna información básica sobre la naturaleza de la aglicona, el lugar de la glicosidación de la antocianina y si se encuentra acilada<sup>92</sup>.

Existen varios tipos de fases móviles utilizadas en (RP-HPLC). Si las antocianinas que se desea separar son similares estructuralmente se utiliza gradientes de elución binarios y cuando la mezcla es muy compleja se utiliza gradientes de elución ternarios (Hyoung 1992). Los solventes usados generalmente son agua, acetonitrilo y metanol, los cuales deben mantenerse a pH menor a 2, para lo cual se utiliza ácido acético, fórmico o trifluoroacético.

Teniendo en cuenta las columnas, fases móviles y estructura de las antocianinas, se puede también predecir el orden de elución durante un análisis RP-HPLC preparativo. Las antocianinas con mayor número de grupos hidroxilo en el anillo B tienen mayor polaridad reteniéndose menos en la columna, mientras que las antocianinas que contengan mayor número de grupos metoxilo son menos polares y eluyen más lentamente. Si la antocianina se encuentra unida a un azúcar su polaridad aumenta, por lo cual el orden de elución se conserva, pero el tiempo de retención es menor. Usualmente, el tiempo de retención de las agliconas se da en el siguiente orden: delphinidina < cianidina < pelargonidina <

---

<sup>89</sup> GHISELLI, A. Op. Cit. p. 24.

<sup>90</sup> DONNER, H; Gao, L; Mazza, G. Separation and characterization of simple and malonylated anthocyanins in red onions, *Allium cepa* L. En: Food Research International. Vol.,30 (1997); p. 637-643.

<sup>91</sup> HYOUNG, S; Lee, V. Chromatographic analysis of anthocyanins, En: Journal of Chromatography. Vol., 624 (1992); p. 221-234.

<sup>92</sup> CEDILLO, C; Cruz, M; Beltrán, M. Identificación de los Espectros de antocianinas del fruto del cerezo dulce (*Prunus Avium*) Variedad sweetheart, en diferentes condiciones de extracción. VII Congreso Nacional de Ciencia de Alimentos. Guanajuato Gto. (2004); p. 351-357.

petunidina < peonidina < malvidina. De acuerdo a la glicosilación de las antocianinas eluirán en el orden: 3,7-diglucósidos < 3,5-diglucósidos < 3-sophorósidos < 3-galactósidos < 3-latirósidos < 3-sambubiósidos < 3-glucósidos < 3-arabinósidos < 3-rutinósidos < 3-ramnósidos<sup>93</sup>. La presencia de grupos acil aromáticos o acil alifáticos aumentan los tiempos de retención.

#### 2.3.4.4 MÉTODOS DE DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN.

La caracterización estructural de diversos polifenoles, especialmente, antocianinas involucra el aislamiento de cada componente mayoritario y posterior detección por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas. La técnica de HPLC con detector de arreglo de fotodiodos (HPLC-DAD), ha sido muy utilizado en la identificación y cuantificación de antocianinas, sin embargo, el alto costo de compuestos de referencia y la dificultad para obtenerlos, representa una desventaja en la utilización de esta técnica. Por lo que, la espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (RMN) se han convertido en las técnicas de mayor elección para ello.

##### a. Espectroscopía UV-Vis

La espectroscopía UV-Vis es una técnica valiosa debido a que proporciona información cualitativa y cuantitativa, requiriendo para ello, baja concentración del material puro y bajos costos. Además, suministra información de gran validez en cuanto a la elucidación estructural de los flavonoides y sus posibles sustituciones. Las antocianinas, por ejemplo, presentan dos bandas de absorción debido a su estructura, una en la región UV (260 a 280) y otra en la región visible (490 a 550). La longitud de onda de máxima absorción depende del tipo de antocianidina, la posición del azúcar y la presencia de grupos acilo<sup>94</sup>.

La longitud máxima de absorción se relaciona con el patrón de hidroxilación; por ejemplo, en una solución de metanol acidificada, pelargonidina 3-glucósido exhibe una  $\lambda_{m\acute{a}x}$  de absorción alrededor de 505 nm, cianidina y peonidina 3-glucósido tienen una  $\lambda_{m\acute{a}x}$  entre 520 y 526 nm mientras que delfinidina, malvidina y petunidina muestran una  $\lambda_{m\acute{a}x}$  entre 532 y 537 nm.

De la relación estructura - longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda_{max}$ ), se pueden calcular algunas relaciones que proporcionan información sobre la estructura de la antocianina. La relación entre la absorbancia a 440nm y la absorbancia a la longitud de

---

<sup>93</sup> GIUSTI, M; Rodriguez, L; Wrolstad R. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and nonacylated pelargonidin-based anthocyanins. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol., 47 (1999); p. 4631-4637.

<sup>94</sup> CASSASA, F; Sari, S. Aplicación de los sistemas CIELAB a los vinos tinto. Correlación con algunos parámetros tradicionales. En: Journal of Enology and Viniculture. Vol., 63 (2006); p. 5669-5684.

onda máxima ( $A_{440} / A_{\lambda_{vis-m\acute{a}x}}$ ), indica la posición de la glicosidación, de manera que valores mayor o igual a 0,3 indica que la glicosidación estará en la posición 3, pero si la relación es menor de 0,2 indica que la antocianina tiene dos glicosilaciones en la posición 3 y 5<sup>95</sup>.

Adicionalmente, la presencia de grupos acilo se ve reflejada en el espectro por la presencia de una tercera banda de absorción en la región de 310 a 360 nm, la relación de absorbancia a estas longitudes de onda ( $A_{acil-m\acute{a}x} / A_{\lambda_{vis-m\acute{a}x}}$ ), da una estimación de la presencia de acilaciones, por lo que, valores menores a 0,4 indica que no hay acilaciones, mientras que valores entre 0,5 y 0,7 determina la presencia de grupos acilo<sup>96</sup>.

El disolvente utilizado para la determinación del espectro afectará a la posición de las bandas de absorción, y por lo tanto se deben tener en cuenta al comparar los datos disponibles en la literatura científica.

Dado que la espectroscopía UV-Vis posee limitaciones en cuanto a la capacidad para identificar los diferentes compuestos mayoritarios, se hace necesario un análisis de confirmación utilizando instrumentos más avanzados.

#### b. Espectrometría de masas (MS).

La espectrometría de masas es una técnica analítica de carácter destructivo, capaz de proporcionar la masa molecular de un compuesto, mejorado eficazmente el análisis de sustancias no volátiles que se encuentran en mezclas complejas<sup>97</sup>.

El acoplamiento del espectrómetro de masas a un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (HPLC-MS) por medio de interfases especiales, como la Ionización Electrospray (ESI), lo convierten en una poderosa herramienta para la determinación tanto cualitativa como cuantitativa de compuestos en mezclas complejas, siendo ésta, una técnica de ionización suave, que puede producir iones intactos de especies grandes y complejas en solución<sup>98</sup>, incluso de especies térmicamente lábiles, no volátiles y especies polares. Todas estas técnicas acopladas, permiten conocer el peso molecular, así como los patrones de fragmentación, con lo cual, se logre determinar aproximadamente el tipo de antocianidina y los azúcares presentes en la matriz.

---

<sup>95</sup> ESCRIBANO, M. Op. Cit. p. 13.

<sup>96</sup> GIUSTI, M; Wrolstad, R. Op. Cit. p. 37.

<sup>97</sup> KUSKOSKI, E; Vega, J; Rios, J; Fett, R; Troncoso, A; Asuero, A. Characterization of anthocyanins from the fruits of baguacu (*Eugenia umbelliflora* Berg). En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol., 51 (2003); p. 5450–5454.

<sup>98</sup> VALLEJO, F; Barberán, A. Characterization of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italic) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry. En: J. Chromatogr. A. Vol., 1054 (2004); p. 181-193.

Los espectros de masa de las antocianinas no tienden a ser muy complejos y prácticamente dependen de la identidad del azúcar que se encuentra unido a la aglicona. Un fragmento adicional puede corresponder a un grupo acilo presente en la estructura molecular.

### c. Resonancia Magnética Nuclear

Junto con las técnicas anteriores, la Resonancia Magnética Nuclear o RMN, en una y dos dimensiones, es una técnica muy utilizada para elucidación estructural de las señales de resonancia de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de antocianinas individuales en metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )<sup>99</sup>. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de las antocianinas permite reconocer características estructurales importantes, ya sea, la señal en 8,9 (s, H-4) y las señales características de otros protones aromáticos<sup>100</sup>.

La espectroscopía NMR es también más rápida y simple que la técnica HPLC-MS. Estas técnicas pueden servir como un complemento para los métodos más comúnmente usados. Cuando las antocianinas están puras se sigue un protocolo que describe la secuencia de experimentos de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , CAPT, DQF-COSY, TOCSY, HSQC, HMBC y ROESY) que son suficientes para asignar la resonancia de los hidrógenos y carbonos de una antocianina<sup>101</sup>. Con esta secuencia también se determina la posición de uniones entre antocianinas que están en forma de bloque.

## 2.3.5 OTROS MÉTODOS DE ANÁLISIS.

### 2.3.5.1 Cuantificación de Antocianinas Monoméricas.

La cuantificación de antocianinas monoméricas se determina por medio del método de pH diferencial, basado en la capacidad que poseen las antocianinas monoméricas en cambiar el color a diferentes valores de pH. Esta variación de color se debe al cambio producido en su estructura de manera reversible, manifestando como consecuencia de ello, un cambio en la absorbancia.

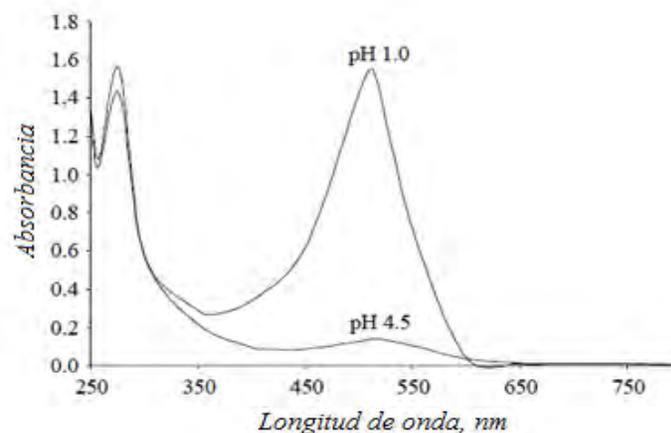
---

<sup>99</sup> LONGO, L; Vasapollo, G. Anthocyanins from bay (*Laurus nobilis* L.) berries. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol., 53 (2005); p.. 8063–8067.

<sup>100</sup> FROYTLOG, C; Slimestad, R. Combination of chromatographic techniques for the preparative isolation of Anthocyanins- applied on blackcurrant (*Ribesnigrum*) fruits. En: Journal of Chromatography. Vol., 825 (1998); p. 89-95.

<sup>101</sup> MATEUS, N; Silva, A; Santos, C. Identification of Anthocyanins – flavanol pigments in red wines by NMR and mass spectrometry. En: J. Agric. Food Chem. Vol., 50 (2002); p. 2110-2116.

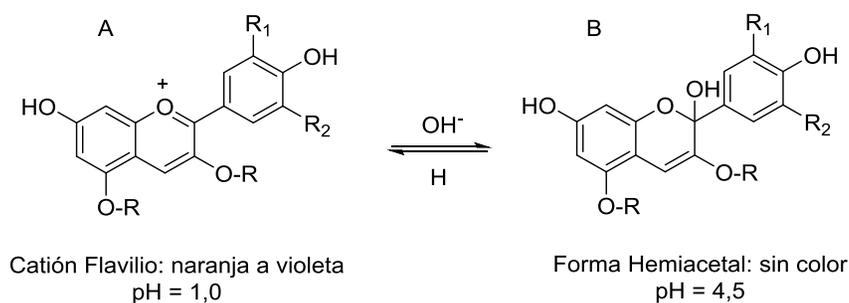
Figura 15. Espectro UV-Vis de antocianinas a pH 1 y pH 4.5.



Fuente: GIUSTI, M. 2005.

En la figura 16 se observa las estructuras químicas a diferentes pHs, donde la forma oxonium (catión flavilio) predomina a pH 1 y la forma hemiacetal a pH 4,5, permitiendo así, una rápida y exacta medida de las antocianinas totales, incluso en presencia de pigmentos polimerizados y de otros compuestos interferentes<sup>102</sup>. Este método fue utilizado por primera vez por Fuleki y Francis (1968), para medir el contenido de antocianinas en arándano<sup>103</sup>.

Figura 16. Estructuras del catión flavilio (A) y la forma hemiacetal (B) (R representa los sustituyentes glicosídicos.)



Fuente: GIUSTI, M. 2005.

La determinación de la concentración de antocianinas totales se realiza calculando la absorbancia por medio de la ecuación:

<sup>102</sup> GIUSTI, M. Op. Cit. p. 37.

<sup>103</sup> FULEKI, T; Francis, F. Anthocyanins as Food Colors. *En: Journal of Chemistry*. Vol., 26 (1968); p. 181–207.

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

En donde es la absorbancia en la longitud de onda máxima a pH 1 y pH 4,5 y es la lectura de absorbancia a 700 nm, tanto a pH 1 como a pH 4,5. La concentración del total de antocianinas monoméricas en la muestra original será:

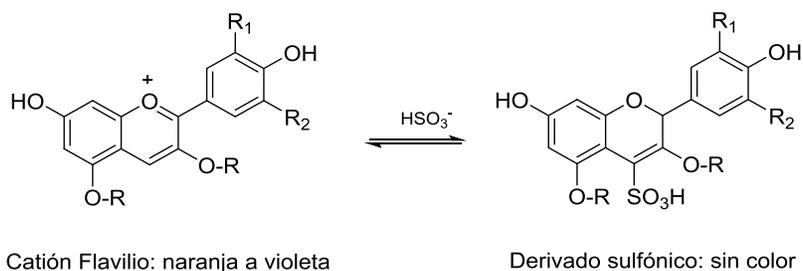
$$\left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = \frac{(A \times PM \times FD \times 1000)}{\epsilon \times l}$$

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

### 2.3.5.2 Color polimérico.

El color generado a partir de antocianinas poliméricas se puede determinar por medio del método de pH sustractivo, el cual se basa en el uso de agentes blanqueadores como el bisulfito de sodio, que decolora las antocianinas monoméricas formando un derivado de ácido sulfónico<sup>104</sup>, el cual no presenta coloración por la pérdida de su conjugación en el anillo C (figura 17).

Figura 17. Reacción de antocianinas con bisulfito para formar un derivado de ácido sulfónico incoloro.



Fuente: WROLSTAD, R. 2005.

<sup>104</sup> WROLSTAD, R; Durst, R; Lee, J. Tracking color and pigment changes in Anthocyanins products. En: Food Science and Technology. Vol., 16 (2005) p. 423-428.

Las antocianinas poliméricas son resistentes al blanqueamiento, de esta forma, el valor de la absorbancia a una longitud de onda máxima visible y a 420 nm de las muestras tratadas con metabisulfito de sodio dependerá solamente de los pigmentos antociánicos poliméricos. La proporción de antocianinas monoméricas proporciona un parámetro de calidad en alimentos naturales y procesados<sup>105</sup>.

Estos parámetros incluyen:

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

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

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

Los cálculos para determinar los parámetros de color son:

Muestra sin tratar con bisulfito de sodio:

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

Muestra tratada con bisulfito de sodio:

$$\text{Color polimérico} = [(A_{\lambda_{420}} - A_{\lambda_{700}}) + (A_{\lambda_{\text{vis-máx}}} - A_{\lambda_{700}})] \times FD$$

Porcentaje de color polimérico (%CP):

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

### 2.3.5.3 Fenoles totales.

Para la cuantificación de compuestos fenólicos presentes en una muestra, el método de mayor uso en productos naturales es el de Folin-Ciocalteu, basado en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene una mezcla de ácido fosfotúngstico ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) y ácido fosfomolíbico ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) que se reducen por la transferencia de electrones de los compuestos fenólicos a pH básico,

---

<sup>105</sup> GIUSTI, M. Op. Cit. p. 37.

produciendo una coloración azul, siendo proporcional este color al contenido fenólico en la muestra<sup>106</sup>.

La absorción del color azul obtenido se mide a una longitud de onda máxima de 765 nm. La cuantificación se realiza por medio de una recta de calibrado con patrón de ácido gálico y los resultados se expresa en mg de ácido gálico/100 g de muestra<sup>107</sup>.

### 2.3.6 ESTABILIDAD DEL COLOR DE LAS ANTOCIANINAS.

Debido a las innumerables utilidades que presentan las antocianinas y demás polifenoles, es necesario estudiar su estabilidad frente a diferentes condiciones ambientales, debido a que presentan algunas limitaciones puesto que son moléculas muy reactivas y pueden sufrir cambios.

Factores fisicoquímicos como su conformación estructural, concentración, variación del pH, temperatura, luz y oxígeno<sup>108</sup>, entre otros, afectan a estos pigmentos naturales, cambiando su color de manera reversible y en ocasiones irreversiblemente, y por tanto, se debe determinar algunos parámetros de estabilidad que incrementen el uso de este tipo de pigmentos en la industria de manera que mantengan su estructura estable, sin degradarse.

#### a. Influencia del pH:

Las antocianinas pueden presentar cambios de coloración dependiendo del valor del pH cuando están en solución, comportándose como indicadores ácido-base, esto debido a que presentan una naturaleza iónica de su estructura<sup>109</sup>. A pH ácido ( $\text{pH} \leq 1$ ) el catión flavilio es la especie predominante, presentando una coloración rojiza debido a la conjugación de sus enlaces; el incremento del pH hace que el catión flavilio se vea expuesto a un ataque nucleofílico con agua, produciendo la pseudobase carbinol, en la cual se observa la pérdida de la conjugación molecular y un equilibrio químico con la forma chalcona que puede ser incolora o de color amarillo. El catión flavilio puede también perder un protón con el aumento de pH, presentando la forma quinoidal. Si el cambio de pH persiste ( $\geq 7$ ), la antocianina se degrada debido a la pérdida de la conjugación de sus enlaces, de forma irreversible, formándose la pseudobase chalcona también incolora.

---

<sup>106</sup> HO, C; Lee, C; Huang, M. T. Phenolic compounds in food and their effects on health II. Antioxidants and cancer prevention. American Chemical Society, Washington, DC, (1992).

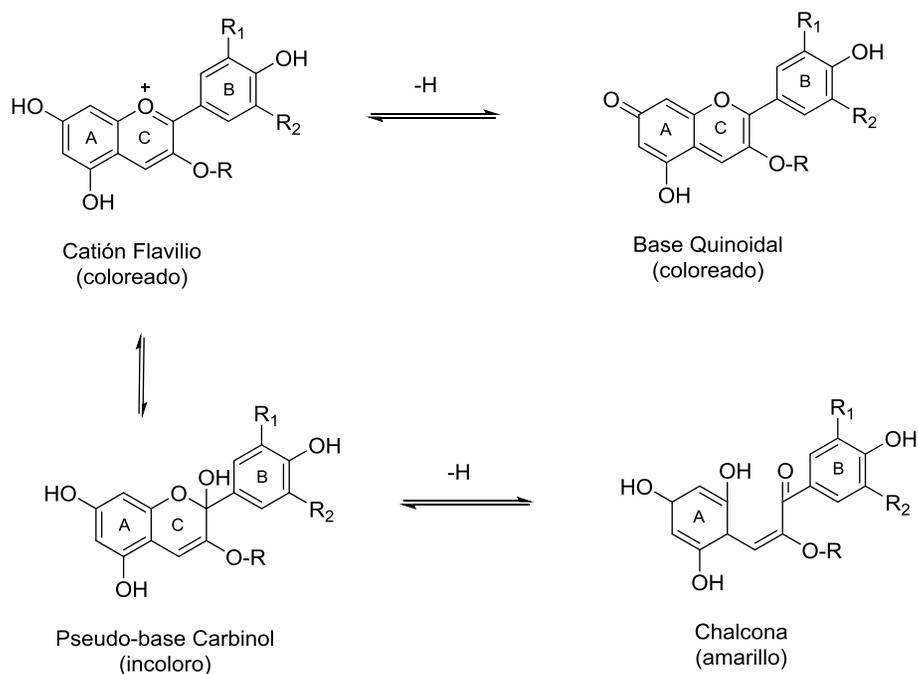
<sup>107</sup> MARTIN, A; Ferreres, F; Tomas-Barberán, F. Characterization and quantification of antioxidants constituents of sweet pepper (*Capsicum annum* L.). *En: J. Agric. Food Chem. Vol.*, 52 (2004); p. 861-3869.

<sup>108</sup> TURKER, N. *Op. Cit.* p. 34.

<sup>109</sup> COOPER, G. Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *En: Phytochemistry. Vol.*, 56 (2001); p. 229–236.

En la figura 18 se observa entonces, que las antocianinas sufren variaciones estructurales en solución acuosa, con el cambio de pH. Este factor no influye demasiado en las antocianinas aciladas, debido a que los radicales acilo interactúan con los núcleos de flavilio, logrando así brindar una mayor estabilidad a la copigmentación intramolecular, además de prevenir la reacción de hidratación del C2 de la molécula<sup>110</sup>.

Figura 18. Variación estructural de antocianinas dependiendo del pH.



Fuente: HERNANDEZ, A. 2003.

Investigaciones acerca de la estabilidad de las antocianinas con variación del pH, concluyen que estos cambios en el color son más significativos a pH alcalino debido a la formación de intermediarios inestables<sup>111</sup>.

#### b. Efecto de copigmentación:

La copigmentación es un fenómeno químico en el que una aglicona interactúa con otros flavonoides, polisacáridos, ácidos carboxílicos o incluso complejos con metales, formando

<sup>110</sup> DaCOSTA, C; Horton, D; Margolis, S. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis. En: Journal of Chromatography A. Vol., 881 (2000); p. 403–410.

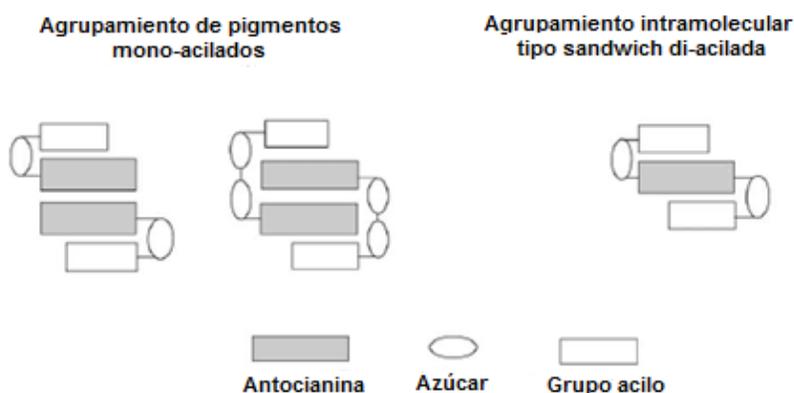
<sup>111</sup> WROLSTAD, R. Op. Cit. p. 37.

moléculas o asociaciones complejas, que generan un cambio o un incremento en la intensidad del color más estable.

Los co-pigmentos son sistemas ricos en electrones  $\pi$  que son capaces de asociarse con iones flavilio, los cuales son pobres en electrones. Esta asociación proporciona protección al ataque nucleofílico del agua en la posición 2 del ion flavilio y de otras especies, tales como peróxidos en la posición 4<sup>112</sup>. Los co-pigmentos son generalmente poco coloreados, pero cuando se mezclan con un solución antocianica, puede aumentar la intensidad del color, produciendo un efecto hiperocrómico, y un desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción en el espectro de absorción UV-Vis mayor (efecto batocrómico) o menor (efecto hipsocrómico).

Hay una copigmentación con antocianinas di-aciladas produciendo una estructura de apilamiento con interacciones hidrofílicas entre los grupos acilos del anillo aromático y la carga positiva del núcleo pirilio, disminuyendo la formación de pseudobases (figura 19). En el caso de antocianinas mono-aciladas, sólo el lado del anillo pirilio puede ser protegido contra ataques nucleofílicos del agua y así solo podría ocurrir un efecto intermolecular débil<sup>113</sup>.

Figura 19. Mecanismos de estabilización de antocianinas aciladas – configuración espacial propuesta y apilamiento de antocianinas aciladas.



Fuente: MATSUFUJI, H. 2003.

<sup>112</sup> MATSUFUJI, 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.

<sup>113</sup> GIUSTI, M. Op. Cit. p. 37.

c. Efecto de enzimas:

Existe varias enzimas relacionadas con la decoloración de las antocianinas, presentes en la mayoría de los tejidos vegetales. Generalmente, han sido identificadas como glucosidasas o fenolasas, las cuales catalizan la oxidación de compuestos fenólicos<sup>114</sup>.

d. Efecto de la Temperatura:

La temperatura es fundamental en la industria alimentaria, ya sea en el procesamiento del producto, como también en el almacenamiento del mismo; siendo por tanto, fundamental la evaluación de este parámetro y su intervención en la degradación de pigmentos de origen natural. En general, los flavonoides son más estables ante el calor y las reacciones de oxidación comparados con las antocianinas, y resisten la mayoría de tratamientos térmicos que se emplean en la manufactura de alimentos procesados.

Existen estudios que indican el cambio estructural del catión flavilio a la forma chalcona, cuando las temperaturas son altas, siendo el primer paso para la degradación térmica de las antocianinas, puesto que puede favorecer la hidrólisis del enlace glucosídico o el desplazamiento de los equilibrios hacia las formas chalcona, lo que provoca un decrecimiento en la intensidad del color o pérdida total de este, siendo la reacción inversa demasiado lenta<sup>115</sup>. En general, los mismos factores estructurales que aumentan la estabilidad del pH de las antocianinas, también incrementan su estabilidad térmica.

e. Efecto de la Luz:

La luz es capaz de acelerar algunos cambios fotoquímicos, ocasionando eventualmente la degradación de la antocianina a la forma chalcona, limitando las aplicaciones como aditivo alimenticio<sup>116</sup>. La resistencia a la degradación fotoquímica es denominada “light fastness”.

f. Efecto del aire:

El aire, junto con factores como pH, luz y temperatura pueden hacer que la antocianina se degrade hasta la forma chalcona. Sin embargo, existe un efecto de estabilización cuando el pH es bajo, dentro de los límites normales de un jugo de fruta, debido a que en estas

---

<sup>114</sup> JACKMAN, R; Yada, R; Tung, M; Speers, R. Anthocynins as food colorants – a review. En: Journal Food Biochemistry. Vol., 58 (1987); p. 201-247.

<sup>115</sup> CABRITA, L. Op. Cit. p. 13.

<sup>116</sup> FLESCHUT, J; Kratzer, F; Rechkemmer, G; Kulling, S. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. En: European Journal of Nutrition. Vol., 45 (2006); p.. 7–18.

condiciones, el equilibrio entre la forma catiónica coloreada y la pseudobase incolora, se desplacen hacia la estructura coloreada más estable<sup>117</sup>.

### 2.3.7 Encapsulamiento con Alginato de Sodio:

Se han realizado múltiples investigaciones para tratar de preservar diversas propiedades presentes en sistemas alimenticios, de factores que puedan modificarlos, ya sea luz, aire, humedad, temperatura o pH. Este es el caso de los pigmentos naturales, los cuales han incrementado su demanda, debido principalmente, a sus propiedades antioxidantes y utilidad como colorante.

La incorporación de agentes encapsulantes para preservar estos componentes bioactivos ofrece un medio más allá de las funciones nutricionales básicas para mejorar la salud a través de dieta diaria. De la gran cantidad de polisacáridos biodegradables, el alginato es uno de los candidatos más promisorios para ello, debido a que pueden formar una capa protectora en solución acuosa sin el uso de disolventes orgánicos y a temperatura ambiente<sup>118</sup>. Un ejemplo de los alginatos, es el de calcio que ha sido ampliamente utilizado para la encapsulación de proteínas, antioxidantes, polifenoles, vitaminas, probióticos y en aplicaciones biomédicas<sup>119</sup> reteniendo la actividad biológica del material encapsulado, lo anterior debido a la facilidad de formación de cápsulas envolventes, naturaleza no tóxica y bajo costo.

El alginato se encuentra formado por cadenas lineales constituidas por dos unidades repetitivas de residuos de ácido  $\beta$ -D-manurónico y ácidos  $\alpha$ -L-gulurónico. Posee grupos carboxilo libres que reacciona con cationes divalentes, principalmente calcio, para formar geles estables<sup>120</sup>. La visualización de la estructura física es denominada “caja de huevos” por Draget<sup>121</sup> expuesta en la figura 20.

---

<sup>117</sup> EIRO, M; Heinonen, M. Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol., 50 (2002); p. 7461–7466.

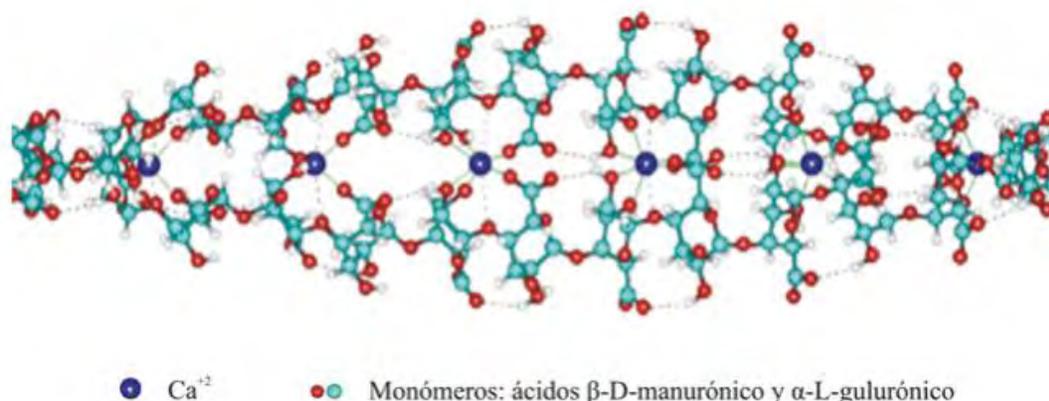
<sup>118</sup> SANTOS, D; Albarelli, J; Beppu, M; Meireles, M. Stabilization of anthocyanin extract from jaboticaba skins by encapsulation using supercritical CO<sub>2</sub> as solvent. En: Food Research International. Vol., 50 (2011); p. 617-624.

<sup>119</sup> XIONG, S; Melton, L; Easteal, A; Siew, D. Stability and antioxidant activity of black currant anthocyanins in solution and encapsulated in glucan gel. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol., 54 (2006); p. 6201-6208.

<sup>120</sup> KING, A. Brown Seaweed Extracts (Alginates). En: Food Hydrocolloids. Vol., 3 (1983); p. 115.

<sup>121</sup> DRAGET, K. Alginates. En: Handbook of hydrocolloids. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited -Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC. (2000); p. 379-395.

Figura 20. Ordenamiento estructural del alginato con iones calcio “Modelo caja de huevos”.



Fuente: DRAGET, K. 2000.

La encapsulación con alginatos, se lleva a cabo por extrusión de goteo de una solución de alginato a través de un medio de gelificación de cloruro de calcio. Debido a las interacciones electrostáticas con iones de calcio, el alginato forma una estructura de red y la reticulación para la formación de hidrogel se produce.

### 2.3.8 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO*.

Las antocianinas al igual que los demás flavonoides, tienen una estructura química adecuada para actuar como antioxidantes, es decir, pueden retrasar o inhibir significativamente la oxidación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RONS), los cuales poseen un electrón desapareado en el orbital externo de su estructura atómica, lo que hace que a nivel celular, tenga una alta reactividad frente a moléculas presentes en la célula, tales como: carbohidratos, lípidos, proteínas; comprometiendo en los seres humanos, la integridad del ADN y causando múltiples enfermedades degenerativas<sup>122</sup>. Los antioxidantes, por tanto, sirven como inhibidores del proceso corrosivo de la oxidación, protegiendo de esta manera a las células.

La producción de estos radicales libres se debe a factores externos, ya sea, polución, radiación ultravioleta; como internos, durante la respiración mitocondrial, en el metabolismo normal de la célula, los cuales se acumulan en los tejidos. Cuando el tejido

---

<sup>122</sup> KAHKONEN, M; Hopia, A; Heinonen, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. *En: Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol., 49 (2001); p. 4076–4082.

alberga altas concentraciones de estos radicales, puede presentarse problemas como la arteriosclerosis, envejecimiento prematuro, cáncer, entre otros<sup>123</sup>.

Una actividad antioxidante óptima proveniente de los polifenoles se relaciona con la presencia de grupos hidroxilos, los cuales confieren una elevada estabilidad al radical formado. Los grupos hidroxilo libres en la posición 3 del anillo C y en la posición 5 del anillo A son donadores de electrones, siendo el caso de las teaflavinas y catequinas presentes en el té<sup>124</sup>. Además, en los flavonoles, los hidroxilos en las posiciones 2', 3' y 4' incrementan la estabilidad de los radicales permitiendo la deslocalización de electrones en los dobles enlaces del anillo benceno.

La presencia de sustituyentes voluminosos en los anillos, que inducen la donación de electrones, tiene dos efectos: aumenta la efectividad como antioxidantes de los compuestos fenólicos al disminuir la fuerza de los enlaces O-H y, por otro lado, el impedimento estérico generado por los sustituyentes en la región del radical, disminuye la velocidad de las reacciones de propagación en la que está implicado el propio radical fenoxilo, contribuyendo a su estabilización.

Diferentes métodos se han desarrollado para determinar la actividad antioxidante *in vitro* en frutos de interés, donde la presencia de antioxidantes de origen natural inhibe la generación de sustancias cromógenas de naturaleza radical y su efecto se analiza por espectroscopía Uv-vis, detectando la disminución en su concentración por efecto del antioxidante. Diferentes compuestos radicales se emplean para ello a nivel *in-vitro*, entre los cuales se encuentran ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazonil-6-ácido sulfónico), DPPH (2,2-difenil-1-picrahidrazil), DMPD (N,N-dimetil-p-fenilendiamina), DMPO (5,5-dimetilpirrolidinaN-óxido) y FRAP (reducción antioxidante férrico).

El método TEAC permite evaluar la capacidad antioxidante, con base en la medida de la reacción con radicales como el ABTS<sup>••</sup>. La unidad de medida o comparativa es el factor Trolox o TEAC (capacidad antioxidante equivalente a trolox)<sup>125</sup>. Este método se emplea comúnmente, ya que se usa en materiales biológicos, compuestos puros o extractos coloreados, sin interferir debido a que presenta absorbancias máximas en la región infrarroja (734 nm), reduciendo posibilidades de interferencias que absorben en la región del visible.

---

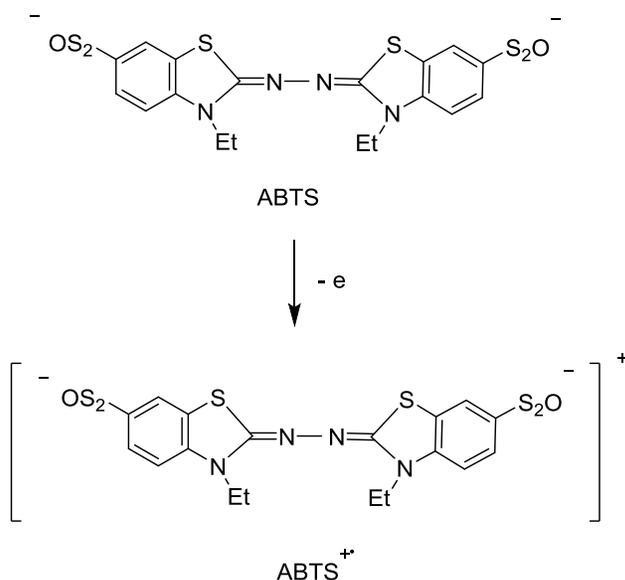
<sup>123</sup> KAPADIA, G. O. Cit. p. 22.

<sup>124</sup> IWAI, K; Onodera, A; Matsue, H. Identification and antiradical properties of anthocyanins in fruits of *Viburnum dilatatum* thunb. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol., 51 (2003); p. 6173–6177.

<sup>125</sup> HENRIQUEZ, C; Aliaga, C; Lissi, E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. (2002); p. 659-660.

El cromóforo ABTS (2,2 azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) presenta un color azul/verde con máximo de absorción a  $\lambda$  342 nm, soluble en agua, cuenta con muy buena estabilidad química, es fácil de reproducir y tiene viabilidad económica. El radical  $ABTS^{\bullet+}$  se forma haciendo reaccionar persulfato de sodio con ABTS, este radical tiene espectros de máxima absorbancia a 734nm en medio alcohólico<sup>126</sup> (figura 21). La ventaja del radical es su estabilidad cuando se encuentra en refrigeración y lejos de la luz. Estos factores permiten almacenar la solución de trabajo por aproximadamente seis meses.

Figura 21. Representación de la reacción de ABTS con persulfato de sodio.



Fuente: Henríquez, C. 2002.

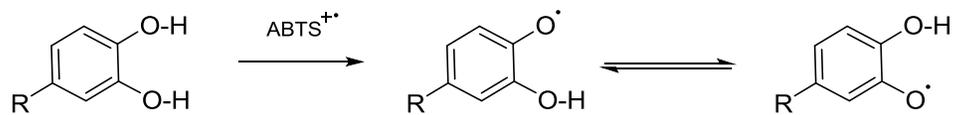
El método permite expresar los resultados de acuerdo a la capacidad del antioxidante para donar un hidrógeno y estabilizar el radical ABTS. La decoloración de la solución en esta reacción, se compara con la decoloración hecha por un antioxidante estándar derivado de la vitamina E conocido como Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico), mediante una recta de calibrado, por eso el resultado se expresa como capacidad antioxidante en equivalentes de trolox ó TEAC<sup>127</sup>. Según Garcia (2004) la delfinidina, petunidina y malvidina tienen de 3 a 6 veces mayor capacidad antioxidante comparada con el antioxidante estándar Trolox<sup>128</sup>.

<sup>126</sup> RE, R; Pellegrini, N; Proteggente, A; Pannala, A. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *En: J. Free Radical Biology and Medicine*. Vol., 26 (1999); p. 1231-1237.

<sup>127</sup> RE, R. Op. Cit. p. 54.

<sup>128</sup> GARCÍA, M. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *En: Cienc. Tecnol. Aliment.* Vol., 24 (2004); p. 691-693.

Figura 22. Representación de la reacción del catión radical  $ABTS^{+\bullet}$  con compuestos fenólicos.



Fuente: Henríquez, C. 2002.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 EXTRACCIÓN DEL PIGMENTO.

##### 3.1.1 Recolección del material vegetal.

La recolección del fruto se realizó en la ciudad de Pasto, Nariño. Las características del árbol y su clasificación taxonómica se determinaron en el Herbario de la Universidad de Nariño (código: 45170).

Se recolectó una muestra representativa de la población vegetal, cosechando frutos maduros mediante un modelo de muestreo aleatorio simple de 10 árboles silvestres, hasta completar un peso aproximado de 2,6 kg en base húmeda. La cosecha se realizó teniendo en cuenta características visuales del fruto (igual tamaño y color). Todas las recolecciones se realizaron manteniendo constante la hora de colecta (10 a.m.) durante días soleados, conservando así las mismas condiciones de recolección. Una vez seleccionados los frutos se empacaron para su transporte y posterior almacenamiento en refrigeración.

Figura 23. Árbol de Capulí (*Prunus serótina* Ehrh var. *capulí*).



Fuente: Esta investigación.

### 3.1.2 Determinación de la madurez.

#### a) Sólidos Solubles Totales (SST).

Los sólidos solubles totales o °Brix se midieron según la norma técnica colombiana NTC 4624. Se adicionó una gota de pulpa de fruta sobre el vidrio inferior de un refractómetro, luego se cerró y se tomó la medida a contraluz en escala de °Brix. El refractómetro utilizado fue un ATAGO HRS-500.

#### b) Acidez titulable y pH.

La acidez titulable fue determinada siguiendo el procedimiento estándar AOAC<sup>129</sup>, a partir de 30 g de fruto. El resultado fue expresado como porcentaje de ácido cítrico. El pH fue determinado usando pH-metro C691 (Metrohm Swiss Made Berlin, Alemania) por inmersión del electrodo en el puré del fruto, con previa calibración con soluciones buffer de pH 4 y 7.

### 3.1.3 Obtención del Extracto Crudo (EC).

A partir de 1 Kg de fruta madura se obtuvieron 175,04 g de cáscara que fueron sometidos a extracción con 250 mL de metanol-ácido acético 19:1 (v / v) a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 24h. Al extracto obtenido se le eliminó el solvente en rotavapor a 40°C obteniendo 26,2 g de extracto crudo (EC).

El extracto se disolvió en 50 ml de agua y se le hicieron lavados por triplicado con porciones separadas de 20 ml de hexano y acetato de etilo, con el fin de eliminar compuestos lipofílicos y medianamente polares que no son de interés en este trabajo.

### 3.1.4 Obtención del extracto rico en Polifenoles (EP).

La fase acuosa fue sometida a una retención selectiva en una columna empacada con Amberlita XAD-7 (80 x 3 cm, figura 24) (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI, USA) de acuerdo al procedimiento descrito por Degenhardt (2000)<sup>130</sup>. Después de lavado exhaustivo con 4 L de agua, los polifenoles retenidos se eluyeron con 500 mL de metanol-ácido acético 19:1 v/v. El solvente se eliminó en rotavapor y el residuo se liofilizó

---

<sup>129</sup> ICONTEC (Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación). Norma técnica colombiana. Jugos de frutas y hortalizas. Determinación del contenido de sólidos solubles. Método refractométrico - NTC 423 y NTC 4624. 1999.

<sup>130</sup> DEGENHARDT, H; Knapp, P; Winterhalter, L. Separation and purification of anthocyanins by highspeed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol., 48 (2000); p. 338–343.

obteniendo 2,63 g de extracto purificado (EP). Este procedimiento se repitió 4 veces con el fin de obtener una cantidad considerable de esta fracción necesaria para posteriores análisis.

Figura 24. Retención selectiva de polifenoles con Amberlita XAD-7.



Fuente: Esta investigación.

### 3.1.5 Obtención del extracto rico en antocianinas monoméricas (ERM).

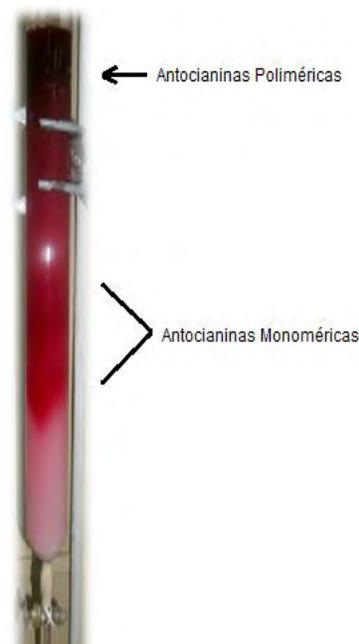
Para separar las antocianinas monoméricas y poliméricas se utilizó el procedimiento descrito por Henke (1995)<sup>131</sup>. Se pesó 0,3 g del extracto rico en polifenoles (EP) y se disolvió en metanol. Esta solución fue sometida a una extracción selectiva en una columna empacada con Sephadex LH-20 Sigma (40 x 3 cm).

La fracción de compuestos con bajo peso molecular (fracción monomérica), se eluyó con una mezcla metanol-agua (1:1) con ácido trifluoroacético al 0.1%. La fracción polimérica fue eluída con una mezcla de acetona-agua (2:1) con ácido trifluoroacético al 0.1%.

---

<sup>131</sup> HENKE, H. Preparative Gel Chromatography on Sephadex LH-20, Hüthig GmbH, Heidelberg (1995).

Figura 25. Separación de la fracción monomérica y polimérica por CC con Sephadex LH-20.



Fuente: Esta investigación.

El solvente de estas dos fracciones se eliminó en rotavapor y finalmente las muestras se secaron. Este procedimiento se repitió por triplicado, obteniendo así 0,753 g de extracto rico en antocianinas monoméricas (ERM).

### 3.1.6 Análisis por HPLC Analítica.

El análisis por cromatografía líquida (HPLC) fue llevado a cabo en un cromatógrafo Waters 1525 (figura 26), equipado con un detector de arreglo de diodos UV/Vis (DAD, Waters 2998) y dos bombas (Waters 1225 Binaria). El equipo también contaba con una válvula de inyección con un loop de 20  $\mu$ L. Los datos de UV fueron adquiridos y procesados usando un software Empower.

Para el análisis del extracto rico en polifenoles (EP) y la fracción monomérica obtenida por sephadex (ERM) se utilizó una columna X-terra RP-18 (100  $\times$  4.6 mm, 3,5  $\mu$ m). Como fase móvil, se usó una mezcla de solventes así: A, (agua : ácido fórmico : acetonitrilo, 87:10:3 v/v/v) y B, (agua : ácido fórmico : acetonitrilo, 40:10:50 v/v/v) a una velocidad de flujo de 0.8 mL/min, con el siguiente gradiente: 0 min, 6%B; 0-10 min 6% B hasta 20% B; 10-20 min, de 20% B hasta 40% B; 20-25 min, de 40% B hasta 50% B; 25-30 min, de 50% B hasta 6% B.

Para el acondicionamiento del sistema fue necesario mantener un flujo inicial de 1 mL/min durante diez minutos al 100% de cada solvente. Las muestras se disolvieron en 1 mL de la fase móvil A y se filtraron con un cartucho de 0,45 m de diámetro de poro.

Figura 26. Equipo HPLC-DAD Waters 2525.



Fuente: Esta investigación.

### 3.1.7 Purificación de pigmentos mayoritarios por HPLC preparativa.

La separación de los pigmentos mayoritarios presentes en el extracto rico en antocianinas monoméricas (ERM) se realizó en el equipo de HPLC descrito en el apartado 3.1.6 al cual se le acopló una columna cromatográfica Geminix C-18 (250 × 10 mm, 5 μm).

Con el fin de encontrar las mejores condiciones de separación se hizo necesario realizar diferentes ensayos, teniendo como variables el gradiente de elución y el flujo de la fase estacionaria. Finalmente, la mejor separación se obtuvo usando una mezcla de las fases móviles A y B en relación 70:30 a un flujo de 2 mL/min. En los ensayos se usó un volumen de inyección de 200 μL y una concentración de 20 mg/mL.

## 3.2 CARACTERIZACIÓN DEL PIGMENTO.

### 3.2.1 Cromatografía de Capa Fina.

La fracción monomérica obtenida por sephadex (ERM) se analizó por cromatografía de capa delgada, de acuerdo al procedimiento descrito por Look (1997)<sup>132</sup>, empleando como fase estacionaria papel whatman N° 3 (20 x 3 cm), y como fase móvil n-butanol/ácido acético/agua (4:1:5).

---

<sup>132</sup> LOCK, O. Colorantes Naturales. Lima: Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. (1997) p. 125.

### 3.2.2 Caracterización por Espectroscopía UV/Vis.

Las características espectrales de los componentes purificados por HPLC preparativa se determinaron usando un espectrofotómetro Pharo Merck en el intervalo de 200 a 800 nm.

Figura 27. Espectrofotómetro Pharo Merck.



Fuente: Esta investigación.

### 3.2.3 Caracterización de los componentes mayoritarios por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS).

El extracto rico en polifenoles (EP) y la fracción monomérica obtenida por sephadex (ERM), se analizaron en un equipo de HPLC-MS Shimadzu LC 2010. El voltaje del detector fue de 1.5 kV, se trabajó con una interfase Electrospray (ESI), modo positivo y un rango de masa de 100-1500.

Se usó una columna Shimadzu C18 110A (5  $\mu\text{m}$ , 50 x 4.6 mm) y las fases móviles utilizadas fueron las mismas que se usaron en HPLC en modo analítico.

### 3.2.4 Determinación del espectro RMN $^1\text{H}$ para los componentes mayoritarios.

Para confirmar la estructura de las antocianinas mayoritarias 1 y 2 purificadas por HPLC, se analizaron por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y por técnicas bidimensionales. Un flavonoide incoloro no fue posible analizarlo por esta técnica debido a que no se obtuvo suficiente cantidad de muestra durante la separación por HPLC.

### 3.3 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS.

#### 3.3.1 Antocianinas Monoméricas.

El contenido de antocianinas monoméricas se determinó por espectroscopía UV-Vis con el método de pH diferencial. Para ello, se prepararon soluciones de los extractos EC (0,5% p/v) y EP (0,2% p/v), ajustando el pH a 1 y 4,5 con soluciones de KCl/HCl (0.025 M) y CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa (0.4 M) respectivamente.

La absorbancia de cada solución fue medida a la longitud de onda de máxima absorción y 700 nm, con agua destilada como blanco. Las medidas se realizaron por triplicado y la concentración de antocianinas fue expresada como equivalentes de cianidina 3-glucosido/100 g de fruto<sup>133</sup>.

#### 3.3.2 Antocianinas Poliméricas.

El contenido de antocianinas poliméricas en los extractos EC y EP se determinó por medio del método de pH sustractivo. Se prepararon soluciones de los extractos utilizando como solvente un buffer de KCl/HCl (0.025 M) a pH 1.

Las soluciones se prepararon siguiendo el mismo procedimiento usado para el método del pH diferencial. Posteriormente, 2.8 ml de la muestra se transfirieron en dos tubos de ensayo; al primer tubo se le adicionó 0.2 mL de metabisulfito de sodio al 40% en agua y el segundo tubo se le agregará 0.2 mL de agua destilada. Transcurridos 15 minutos se midieron las absorbancias a 420 nm, a la longitud de onda de máxima absorbancia y a 700 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Pharo Merck.

#### 3.3.3 Fenoles Totales.

El contenido fenólico de los extractos EC y EP se determinó mediante valoración colorimétrica usando el reactivo de Folin Ciocalteau. La reacción se realizó con una alícuota (0.1 mL) del extracto EC (2500 ppm) y EP (540 ppm), 0,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteau (0,2 M) y 1.5 mL de una solución acuosa de carbonato de sodio (20% p/v); aforando a 10 mL con agua destilada<sup>134</sup>.

La mezcla se mantuvo en reposo durante 2 horas y posteriormente usando un espectrofotómetro UV-Vis Pharo Merck se midió la absorbancia a 765 nm. Con el fin de

---

<sup>133</sup> WROSTAD, R. Op. Cit. p. 12.

<sup>134</sup> VELIOGLU, Y; Mazza, G; Gao, L; Oomah, B. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol., 46 (1998); p. 4113–4117.

medir la concentración de polifenoles en las muestras se construyó una recta de calibrado usando como patrón ácido gálico. Para ello, se prepararon soluciones de ácido gálico en concentraciones de 50, 100, 150, 250 y 500 ppm. El contenido de polifenoles de las muestras se expresó en mg de ácido gálico por 100 gramos de fruto, con el fin de comparar los dos extractos.

### 3.4 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD.

#### 3.4.1 Estabilidad de los extractos.

La estabilidad se evaluó mediante el método descrito por Janna y Khairul (2006)<sup>135</sup>. En este procedimiento se valoró como se afectan las antocianinas de estos extractos frente a factores como pH, luz y aire. Para esto se planteó un diseño experimental que incluyera las variables: pH 3 y 5, presencia de aire, ausencia de aire, presencia de luz y ausencia de luz (60 Vatios).

#### 3.4.2 Procedimiento de encapsulación.

Con el fin de valorar la estabilidad del pigmento encapsulado frente a las mejores condiciones halladas en el numeral anterior (3.3.1), se utilizó la metodología planteada por Santos (2011)<sup>136</sup>. En este proceso, se mezcló una solución de 20 mg/L de extracto EP con alginato de sodio (1,5% p/v). Posterior a ello, se introdujo la mezcla en una bureta y se hizo gotear sobre una solución de cloruro de calcio (2% p/v), formándose esferas de aproximadamente 2,5 mm de diámetro (Figura 28), las cuales se dejaron durante 30 minutos en la solución de CaCl<sub>2</sub>, y luego se lavaron con agua destilada y se filtraron.

---

<sup>135</sup> JANNA, O; Khairul, A. Anthocyanin stability studies in tibouchina semidecandra. En: Journal of biochemistry and molecular biology. Vol., 101 (2007); p. 1642-1649.

<sup>136</sup> SANTOS, D. Op. Cit. p. 43.

Figura 28. Encapsulamiento del extracto EP.



Fuente: Esta investigación.

### 3.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* POR EL MÉTODO TEAC.

El análisis espectrofotométrico de la captura del catión radical  $ABTS^{•+}$  se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Re<sup>137</sup>. Para la generación del catión radical  $ABTS^{•+}$ , se hizo reaccionar en medio acuoso, ABTS (7 mM) con persulfato potásico ( $K_2S_2O_8$  2,45 mM). La solución final se dejó en reposo y en oscuridad durante 24 horas. Una vez formado el radical  $ABTS^{•+}$  (solución stock), se tomó una alícuota y se diluyó en metanol HPLC hasta obtener un valor de absorbancia de  $0,883 \pm 0,002$ , a la longitud de onda de máxima absorbancia (solución W).

Para la reacción, se tomaron 3 mL de la solución W y se adicionaron 30  $\mu$ L de la muestra de interés. La mezcla se homogenizó con un agitador (Fisher Scientific mini vortex) durante 1 minuto y posteriormente se dejó en reposo por 6 minutos. Finalmente, se realizó la medición de absorbancia en un espectrofotómetro Uv-vis PHARO 300.

Se realizó una recta de calibrado con soluciones de Trolox a concentraciones de 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 mM. Los resultados obtenidos se expresaron en Capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC), que se define como el número de milimoles de Trolox que

---

<sup>137</sup> RE, R. Op. Cit. p. 45.

tienen el mismo porcentaje de inhibición que un gramo de muestra y los valores se presentaron como mmol de Trolox/mmol de sustancia. La funcionalidad del método se verificó con un patrón de ácido ascórbico 1,5 mM que según la literatura presenta un valor de  $1,05 \pm 0,02$ <sup>138</sup>. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

---

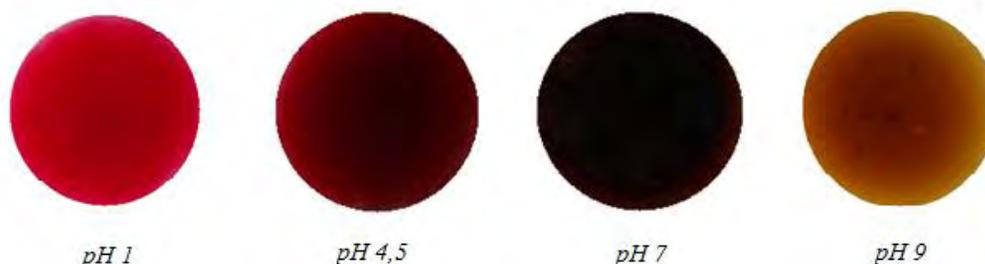
<sup>138</sup> RE, R. Op. Cit. p. 45

## 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1. ENSAYOS PREVIOS.

Una primera aproximación para determinar la presencia de pigmentos tipo antocianina en el epicarpio del fruto de Capulí (*Prunus serótina* Ehrh), consistió en registrar los cambios de color al variar el pH de la solución, utilizando para ello, soluciones de NaOH 1M y HCl 0,1 M. En la figura 29 se observan estos cambios de color de acuerdo a la variación del pH.

Figura 29. Variación del color respecto al pH del extracto del fruto de Capulí.



De acuerdo a la percepción visual, a pH neutro, la solución conserva su color violeta, característico de su estado natural; en medio ácido el color cambia a rojo intenso; mientras que a pH básico ( $\geq 9$ ) se observa un color amarillento, permitiendo evidenciar la presencia de estos pigmentos tipo antocianina en el fruto de Capulí.

### 4.2. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE MADUREZ DEL FRUTO.

Características tanto físicas como químicas del fruto recolectado se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Características iniciales del fruto de Capulí (*Prunus serótina* Ehrh).

<i>Características</i>	<i>Descripción</i>
Color	El fruto maduro presenta una cáscara violeta y una pulpa incolora.
Forma	Baya redonda y achatada.
Textura	Corteza firme, pulpa blanda.
pH	4,67 $\pm$ 0,02

Sólidos totales <sup>a</sup>	18,11 ± 0,54
Acidez <sup>b</sup>	6,02 ± 0,27 %
Índice de madurez (IM) <sup>c</sup>	2,60 ± 0,39

<sup>A</sup> °Brix, <sup>B</sup> %Acido Ascórbico, <sup>C</sup> °Brix/acidez.

### 4.3 CUANTIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS.

#### 4.3.1 Determinación de antocianinas monoméricas.

Se determinó el contenido antocianínico monomérico por el método de pH diferencial, que se basa en la transformación reversible de su estructura al variar el pH; esto se manifiesta con un cambio en la absorbancia, lo que permite una medición rápida y precisa de las antocianinas monoméricas, aún en presencia de pigmentos poliméricos o degradados, ya que estas últimas se resisten al cambio de color al variar el pH.

En la tabla 3 se muestran los datos de absorbancia medidos a la longitud de onda de máxima absorción a pH 1 y pH 4,5. Estos datos se utilizaron para calcular la concentración de antocianinas monoméricas del extracto crudo (EC) y del extracto rico en polifenoles (EP).

Tabla 3. Absorbancias para el extracto EC y EP a pH 1.0 y 4.5.

<i>Réplica</i>	<i>ABS λ<sub>515</sub></i> <i>(EC)</i>		<i>ABS λ<sub>515</sub></i> <i>(EP)</i>	
	<i>pH 1,0</i>	<i>pH 4,5</i>	<i>pH 1,0</i>	<i>pH 4,5</i>
1	0,386	0,117	0,986	0,457
2	0,389	0,119	0,984	0,450
3	0,387	0,116	0,993	0,444
Promedio	0,388	0,117	0,988	0,450
DE	0,001	0,002	0,005	0,007
CV	0,003	0,014	0,012	0,015

La concentración de antocianinas en el extracto EC, calculada mediante la ecuación planteada en el apartado 2.3.5.1 se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Contenido de antocianinas monoméricas para el extracto EC y EP.

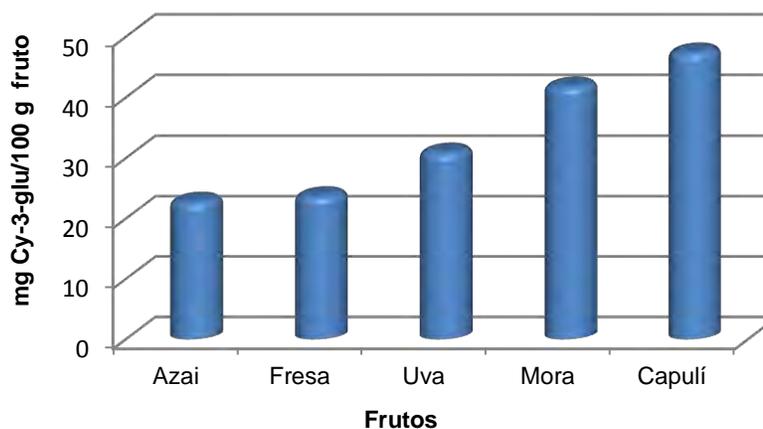
Muestra*	Antocianos totales <sup>a</sup>	Antocianos totales <sup>b</sup>
EC	90,21 ± 0,25	47,38 ± 0,13

<sup>a</sup>mg de Cy-3-glu/L de extracto, <sup>b</sup>mg de Cy-3-glu /100 g de fruto.

\* Datos con ± DE de tres réplicas.

En la figura 30 se presenta comparativamente la concentración en mg de cy-3-glu/100 g de fruto con respecto a otros frutos (evaluados mediante la misma metodología). Se observa que el fruto de Capulí presenta una mayor cantidad de antocianinas monoméricas (47,4 ± 0,1), superior al de frutos como azaí (22,8 ± 0,8), fresa (23,7 ± 2,3), uva (30,9 ± 0,5) y mora (41,8 ± 0,8)<sup>139</sup>, pero inferior en contenido con respecto a frutos como mortiño (142,0 ± 2,4)<sup>140</sup> e ivilan (95,3 ± 0,6)<sup>141</sup>. De acuerdo a estos datos, el fruto en estudio podría ser una potencial fuente de pigmentos para su uso como aditivo de alimentos.

Figura 30. Comparación del contenido antociánico del fruto de Capulí con diferentes frutas.



<sup>139</sup> KUSKOSKI, M. Op. Cit. p. 8.

<sup>140</sup> PORTILLO, D. Op. Cit. p. 13

<sup>141</sup> CHARFUELÁN, C. Op. Cit. p. 13

#### 4.3.2 Determinación de antocianinas poliméricas.

La cantidad de antocianinas poliméricas se determinó por el método de pH sustractivo. Este método se basa en el uso de agentes blanqueadores como el bisulfito de sodio, que decolora las antocianinas monoméricas. La decoloración se debe a que al reaccionar la antocianina con el bisulfito se puesto que forma un derivado de ácido sulfónico, el cual es incoloro debido a la pérdida de su conjugación en el anillo C de la molécula.

Las antocianinas poliméricas son resistentes al blanqueamiento, ya que el sitio de reacción forma enlaces con otras unidades en el proceso de polimerización. De esta forma, el valor de la absorbancia a una longitud de onda máxima visible y a 420 nm de las muestras tratadas con metabisulfito de sodio es debida solamente de los pigmentos antociánicos poliméricos. En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos para el extracto crudo (EC) y el extracto rico en polifenoles (EP), tratados con metabisulfito de sodio.

Tabla 5. Contenido polimérico de los extractos EC y EP.

<i>Muestra</i>	$\lambda_{vis-m\acute{a}x}$ *	<i>Densidad del Color</i> **	<i>Color Polimérico</i> **	<i>% Color Polimérico</i> **
EC	515	9,44 ± 0,08	1,23 ± 0,08	13,05 ± 0,08
EP	515	38,97 ± 0,10	5,57 ± 0,06	14,31 ± 0,16

\* nm, \*\* Datos con ± DE de tres réplicas.

Los resultados observados en la tabla 5, evidencian que durante el proceso de purificación, el color debido a compuestos poliméricos no presentó cambios sustanciales expresados como porcentaje de color polimérico; sin embargo, hay claras diferencias en cuanto a la densidad del color, donde el extracto EP es el que presenta una mayor densidad del color. Se concluye, por lo tanto, que durante el proceso de purificación los compuestos poliméricos también se retienen en la columna (igual que los pigmentos monoméricos).

#### 4.3.3 Determinación de fenoles totales.

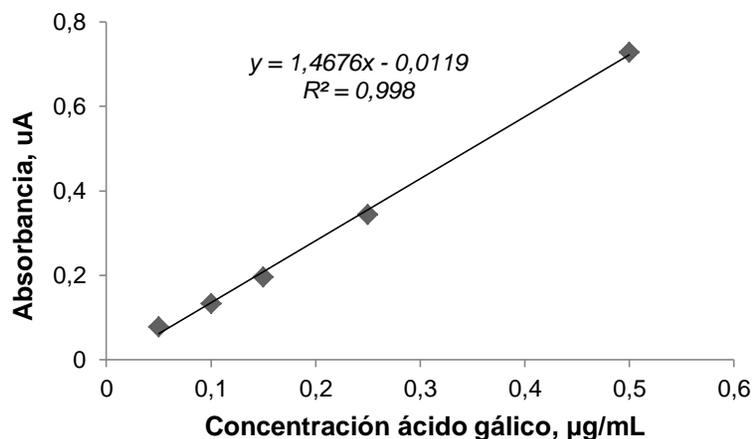
El contenido fenólico del extracto crudo (EC) y del extracto rico en polifenoles (EP) se determinó por el método de Folin Ciocalteu. Se usaron soluciones patrón de ácido gálico entre 50 - 500 µg/mL para construir una recta de calibrado (figura 31).

Tabla 6. Resultados obtenidos del método de Folin con patrones de ácido gálico.

Concentración de ácido gálico <sup>a</sup>	Absorbancia <sup>b</sup>
0	0,078 ± 0,004
100	0,134 ± 0,002
150	0,196 ± 0,005
250	0,345 ± 0,004
500	0,729 ± 0,006

<sup>a</sup> µg/mL, <sup>b</sup> DS de tres réplicas.

Figura 31. Recta de calibrado absorbancia vs. concentración de ácido gálico.



Posteriormente, de la ecuación de la recta se logró calcular el contenido fenólico de los extractos EC y EP; la concentración de fenoles totales se expresaron en mg de ácido gálico/100 gramos de fruta (tabla 7). Se evidencia que la concentración de fenoles para el extracto EP (1417,56) es mayor que para el extracto EC (241,99). Esto demuestra que efectivamente la resina XAD-7 retiene este tipo de compuestos durante el proceso de purificación.

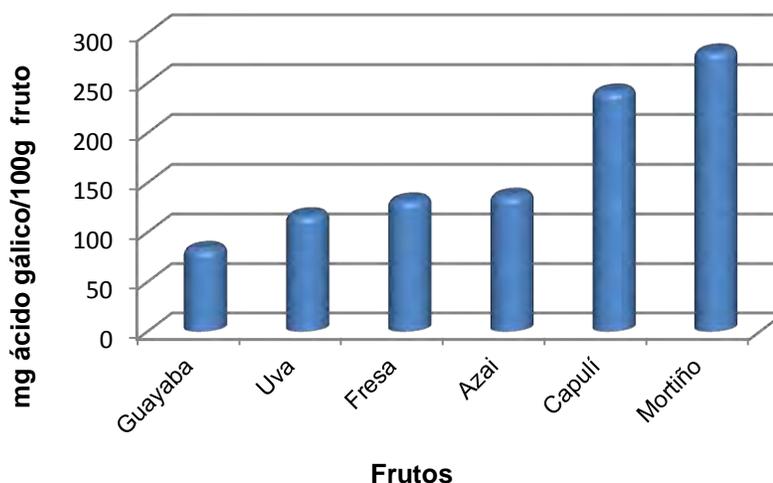
Tabla 7. Contenido fenólico para los extractos EC y EP.

Extracto	Fenoles Totales <sup>a</sup>
EC	241,99 ± 4,10
EP	1417,56 ± 2,10

<sup>a</sup> mg de ácido gálico/100 g de fruta.

Comparando el contenido fenólico del fruto de Capulí con otros frutos (bajo las mismas condiciones metodológicas), se observa que los extractos de Capulí muestran un alto contenido fenólico similar a la del fruto de mortiño<sup>142</sup>, y superando a frutos como ivilan (155,3 ± 0,6)<sup>143</sup>, guayaba (83,0 ± 0,1), fresa (132,1 ± 3,8), uva (117,1 ± 0,6) y azai (136,8 ± 0,4)<sup>144</sup> (Figura 32), demostrando así que este fruto es una importante fuente de compuestos antioxidantes.

Figura 32. Comparación del contenido fenólico en diferentes frutas.



#### 4.4 SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS.

Debido a que la extracción con solventes no es específica para flavonoides, se hizo necesario el aislamiento de estos, por medio de técnicas cromatográficas, utilizando como fase estacionaria amberlita XAD-7 y sephadex LH-20, con el fin de aislar sólo los

<sup>142</sup> PORTILLO, D. Op. Cit. p. 13.

<sup>143</sup> CHARFUELÁN, C. Op. Cit. p. 13.

<sup>144</sup> KUSKOSKI, M. Op. Cit. p. 8.

polifenoles presentes en el fruto. A partir de aproximadamente 1 Kg de fruta se determinó que el fruto contiene: 17,50% de cáscara; 2,63% de fracción soluble en metanol (EC) y 1,12% de fracción retenida por CC usando como soporte sólido amberlita XAD-7 (EP).

#### 4.4.1 Cromatografía de capa delgada (CCD) de la fracción de antocianinas monoméricas.

Los resultados obtenidos por cromatografía de capa delgada muestran que en la fracción monomérica (ERM) están presentes claramente dos señales que evidencian la existencia de dos compuestos antociánicos mayoritarios. Los factores de retención para cada señal 1 y 2 son 0.36 y 0.68 respectivamente.

Figura 33. Cromatografía de capa delgada para el extracto ERM.



Fuente: Esta investigación.

#### 4.4.2 Análisis por HPLC modo analítico del extracto EP.

El análisis por HPLC-DAD del extracto rico en polifenoles (EP) muestra a 280 nm la presencia de 3 señales (Figura 34a). A esta longitud de onda absorben tanto los polifenoles incoloros como los coloreados, sin embargo si observamos el espectro medido a 520 nm (figura 34b), longitud de onda donde absorben los pigmentos antociánicos; es evidente que en este extracto están presentes dos compuestos coloreados.

Figura 34a. Perfil cromatográfico del extracto EP con máximo de absorción a 280 nm.

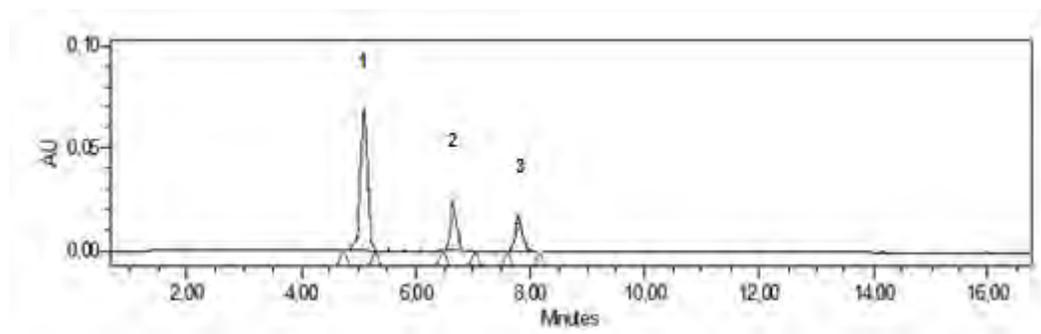
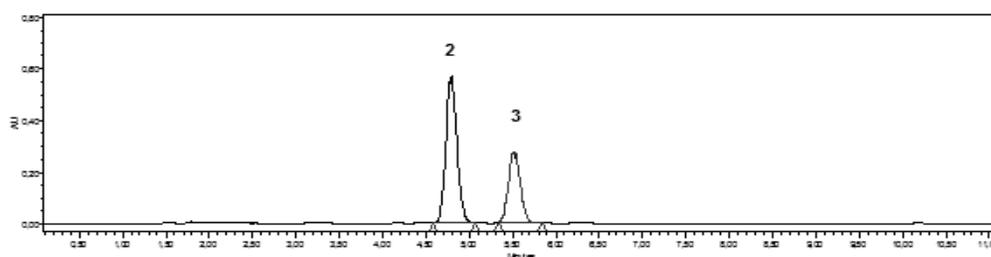


Figura 34b. Perfil cromatográfico del extracto EP con máximo de absorción a 520 nm.



Estos resultados muestran claramente la presencia de dos pigmentos antociánicos, lo que está en concordancia con lo observado por cromatografía en capa delgada (TLC), discutido anteriormente. Los tiempos de retención y las áreas relativas de cada señal se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Tiempos de retención y porcentajes de área para las señales obtenidas en el extracto EP del fruto de Capulí.

<i>Señal</i>	<i>Tr experimental (min)</i>	<i>% Área</i>
2	4,72	70,58
3	5,39	29,42

Observando el espectro UV-Vis (on line) del compuesto 1 (compuesto incoloro), es claro evidenciar que se trata de un polifenol incoloro debido a que presenta absorción alrededor de 280 nm y ausencia de absorción a 520 nm (Figura 35), contrario a lo observado para los compuestos 2 y 3 en donde se evidencia una fuerte absorción alrededor de 520 nm (Figura 36).

Figura 35. Espectro de absorción UV-Vis del primer compuesto incoloro presente en el extracto EP.

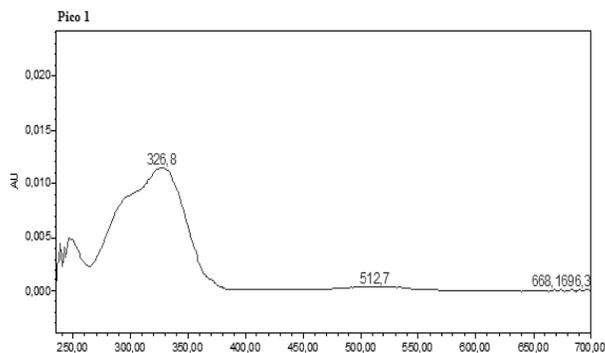
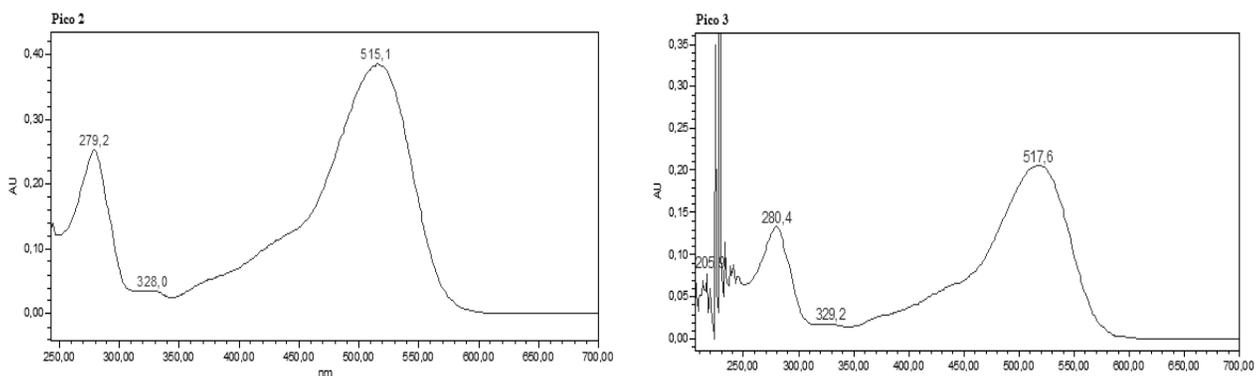


Figura 36. Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos 2 y 3 presentes en el extracto EP.



Con el propósito de obtener fracciones menos complejas, la muestra EP se sometió posteriormente a un nuevo proceso de fraccionamiento por cromatografía en columna (CC). Para esto, se utilizó como fase estacionaria la resina sephadex LH-20, obteniendo dos nuevas fracciones monoméricas, las cuales se separaron por polaridad. Una vez concentradas estas fracciones monoméricas, se analizaron por HPLC (bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente) (figuras 37 y 38).

Figura 37. Perfil cromatográfico de la primera fracción monomérica aislada por CC con sephadex con máximo de absorción a 280 nm.

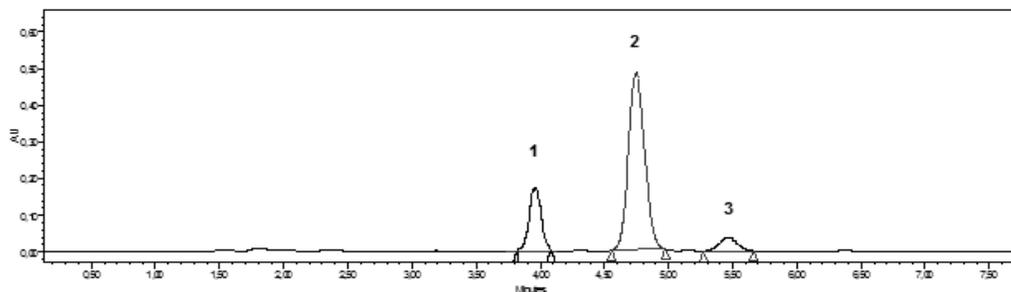


Tabla 9. Tiempos de retención y porcentaje de área para los compuestos mayoritarios contenidos en la primera fracción obtenida por sephadex.

Señal	<i>Tr experimental</i> (min)	% Área
1	3,92	19,97
2	6,31	72,21
3	7,29	7,82

Figura 38. Perfil cromatográfico de la segunda fracción aislada por CC con sephadex con máximo de absorción a 280 nm.

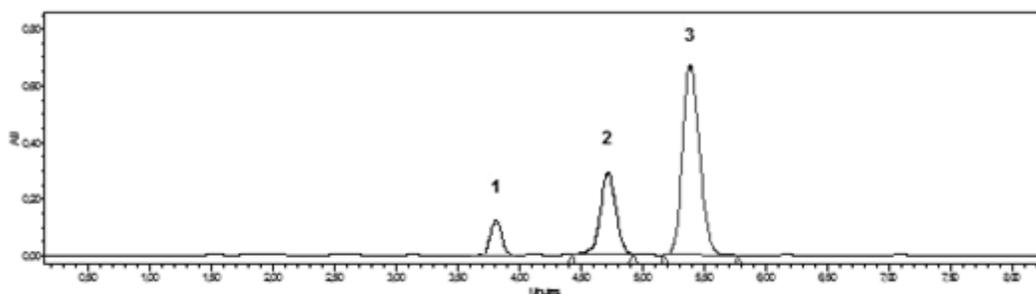


Tabla 10. Tiempos de retención y porcentaje de área para los compuestos mayoritarios contenidos en la segunda fracción obtenida por sephadex.

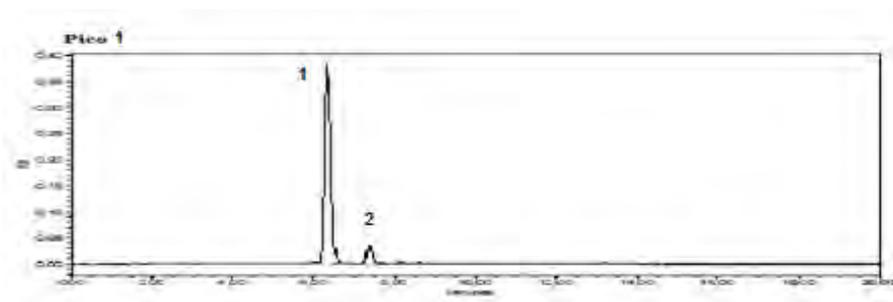
Señal	Tr experimental (min)	% Área
1	3,99	4,31
2	6,37	15,28
3	7,42	80,41

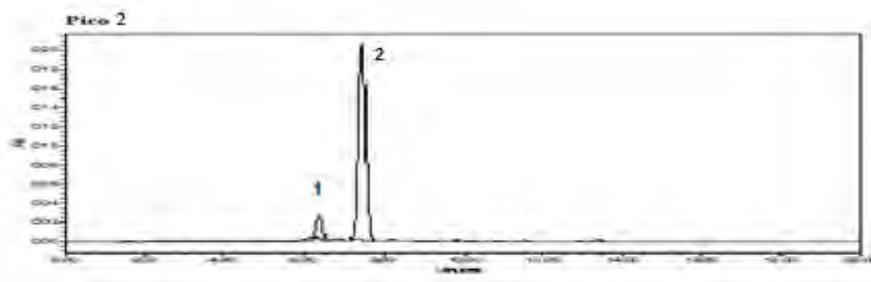
De acuerdo a estos resultados (figuras 37 y 38, tablas 9 y 10) se puede observar que el proceso permitió obtener dos fracciones con diferencias claras en cuanto a su polaridad. Si se tiene en cuenta que el análisis por HPLC se realizó en fase reversa, la primera fracción es más polar que la segunda. Esto se considera un proceso exitoso ya que facilita en gran medida la purificación de los pigmentos mediante cromatografía líquida en modo preparativo.

#### 4.4.3 Análisis por HPLC en modo preparativo del extracto EP.

Los componentes mayoritarios de las dos fracciones obtenidas por CC con resina sephadex a partir del extracto EP, posteriormente se purificaron mediante cromatografía líquida en modo preparativo (HPLC). Luego de diferentes ensayos de separación en modo isocrático, se encontró finalmente que la condición más adecuada para este proceso fue un sistema de solventes en proporción de 70% de A (agua / acetonitrilo / ácido fórmico 87:3:10) y 30% de B (agua / acetonitrilo / ácido fórmico 40:50:10) logrando separar dos componentes mayoritarios en un tiempo de 12 min.

Figura 39. Perfiles cromatográficos de la separación de los componentes mayoritarios por HPLC en modo preparativo.





#### 4.4.4 Espectros UV-Vis de los pigmentos antociánicos aislados.

En las figuras 40 y 41, se muestra los perfiles de los espectros UV-Vis de los pigmentos antociánicos 1 y 2 purificados por HPLC modo preparativo. Los espectros de estos compuestos se tomaron en metanol acidificado con HCl al 1% ya que en esta condición las moléculas se encuentran en su forma flavilio (solución más coloreada).

Figura 40. Espectro UV-Vis del pigmento 1 purificado por HPLC-DAD.

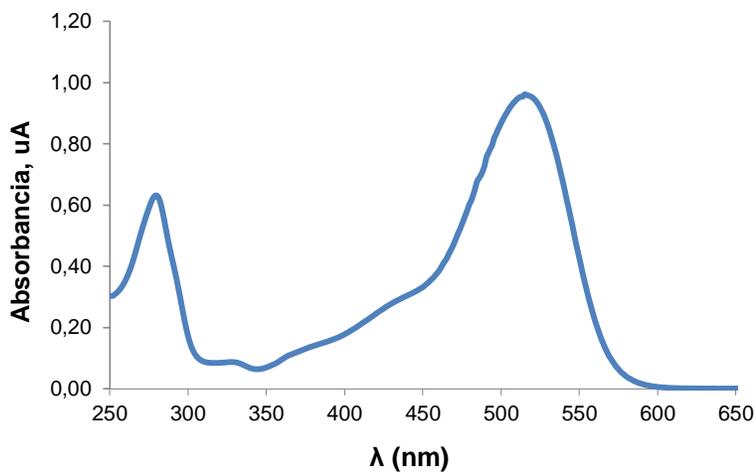
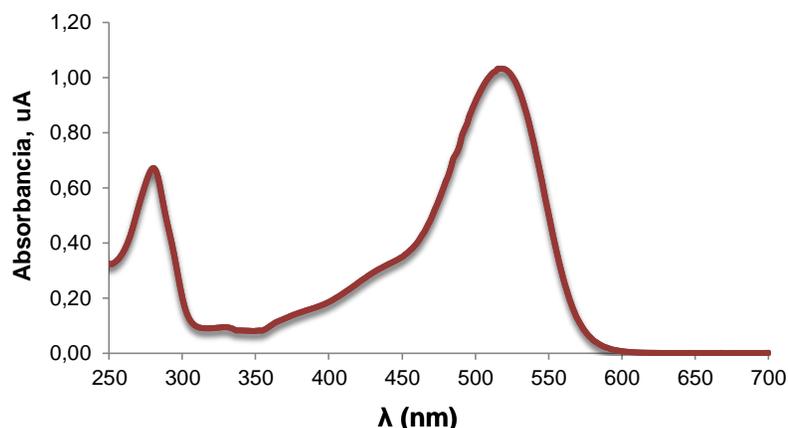


Figura 41. Espectro UV-Vis del pigmento 2 purificado por HPLC-DAD.



Con base en diversas investigaciones<sup>145,146</sup>, es posible deducir algunas características estructurales de la molécula a partir de relaciones de absorbancia. En la tabla 12 se observa que la relación  $A_{440}/A_{Vis-máx}$  mayor a 0,2 para los dos compuestos antocianícos, sugiere que existe una sustitución del grupo hidroxilo en la posición 3 de la molécula por un glicósido.

De otro lado, la presencia de acilaciones se ve reflejada en el espectro por la presencia de una tercera banda de absorción en la región de 310 a 360 nm. El bajo valor encontrado para la relación de absorbancia a estas longitudes de onda ( $A_{UV-máx}/A_{Vis-máx}$ ) indican que en las moléculas no hay acilación<sup>147</sup>, por tanto, se puede decir que en los dos pigmentos no existe la presencia de grupos acilo.

Tabla 11. Parámetros espectroscópicos UV-Vis para las antocianinas mayoritarias presentes en el fruto de Capulí.

<i>Antocianina</i>	$\lambda_{máx}$ (nm)	$\frac{A_{\lambda 440}}{A_{\lambda Vis máx}}$	$\frac{A_{\lambda UV máx}}{A_{\lambda Vis máx}}$
1	515	0,319	0,091
2	517	0,310	0,092

<sup>145</sup> GIUSTI, M. Op. Cit. p. 37.

<sup>146</sup> ANDERSEN, O; Fossen, T; Cabrita, L. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *En: Journal Chemistry*. Vol., 63 (1998); p. 435-440.

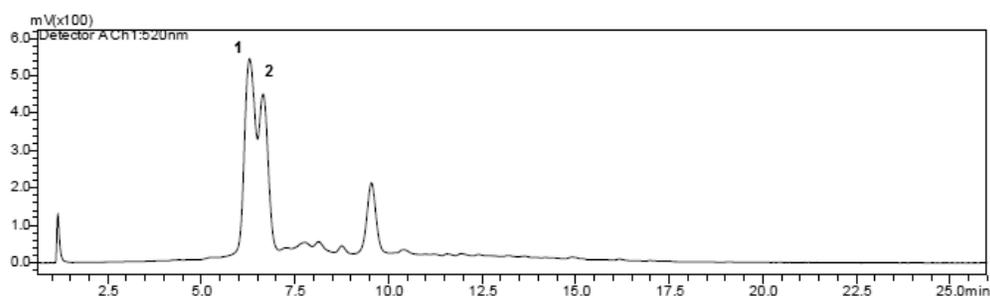
<sup>147</sup> WROLSTAD, A. Op. Cit. p. 38.

#### 4.4.5 ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

El extracto EP se analizó por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con ionización por Electropray (HPLC-MS/ESI), debido a que es una poderosa técnica de caracterización de un gran número de compuestos termolábiles, altamente polares y no volátiles<sup>148</sup>, características principales de las antocianinas.

En la figura 42 se observa que el perfil cromatográfico del extracto EP es similar al perfil obtenido por HPLC en modo analítico (figura 34).

Figura 42. Perfil cromatográfico HPLC-MS del extracto EP.



En el cromatograma se observan dos señales predominantes, que corresponde a los compuestos mayoritarios 1 y 2.

##### > Caracterización estructural de la antocianina 1

La antocianina 1 presenta un tiempo de retención de 5,53 min (figura 42). Los espectros UV-Vis se midieron en el rango de 260-700 nm, determinando así la posición del máximo de absorción en el visible y el porcentaje de intensidad de absorción de 440 nm comparada con la longitud de onda máxima ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ).

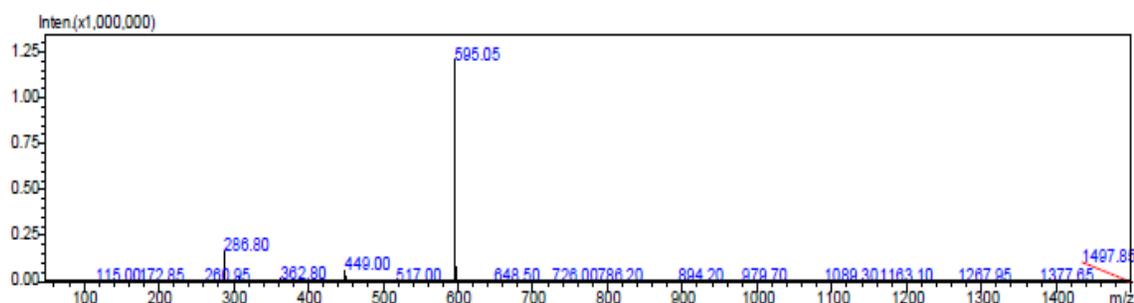
La ausencia de absorción en la región 310-335 permite afirmar que no hay acilación en esta molécula. Además, presenta una relación  $A_{440}/A_{Vis-m\acute{a}x}$  de 30%, que de acuerdo con lo discutido anteriormente en 4.3.4 evidencia la presencia de glicosidación en la posición C3 de esta molécula. Este compuesto presenta un máximo de absorción ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ ) en 517 nm (Figura 40), localizado en la región de 500-525 nm y el cambio de color observado al variar el pH de una solución acuosa, indica la presencia de compuestos tipo antocianina.

De acuerdo con los resultados del análisis ESI-MS (figura 43), la antocianina 1 tiene un peso molecular de 595u. Además, la presencia del ión 287 permite postular como

<sup>148</sup> CARERI, M; Mangia, A; Musci, M. Overview of applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing systems in food analysis: naturally occurring substances in food. *En: Journal chromatography*. Vol., 794 (1998); p. 283.

aglicona a la cianidina<sup>149</sup>. En este compuesto, el ión correspondiente a la aglicona se obtiene por la pérdida de 308u a partir del ión molecular, que concuerda con la pérdida de dos unidades de azúcar, una de 146u (glucosa) y otra de 162u (ramnosa o grupo cumaroil). En el espectro de masas igualmente se observa un ion a m/z 449 que corresponde a una pérdida de 146 u. Como se discutió anteriormente, la presencia del grupo acilo se descarta por la ausencia del máximo pronunciado en el intervalo de 310-335 nm característico de estos grupos.

Figura 43. Espectro de masas de la antocianina 1.

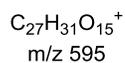
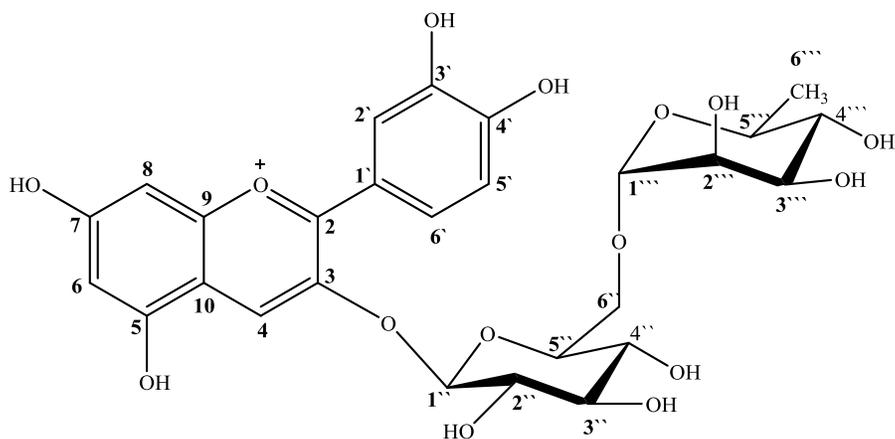


Se sugiere para la antocianina 1 las siguientes características estructurales: a) el pigmento tiene como aglicona la cianidina, b) el pigmento no tiene en su estructura grupos acilo, c) la estructura del pigmento tiene dos unidades de azúcar, d) existe sustitución en C3. Por lo anterior la estructura que se propone para la antocianina 1 es la cianidina-3-O-rutinósido (Figura 50)<sup>150</sup>.

<sup>149</sup> DA COSTA, C; Horton, D. Analysis of Anthocyanins. En: Foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis. En: Journal of chromatography. Vol., 2 (2000); p. 403 – 410.

<sup>150</sup> PUNIT, B; Piya, P; Amit, K; Jayakumar, S; Pawan, G; Nayak, K; Priyadarsini, M. Radioprotection by quercetin-3-O-rutinoside, a flavonoid glycoside – A cellular and mechanistic approach. En: Journal of Functional Foods. Vol., 4 (Oct 2012); p. 924-932.

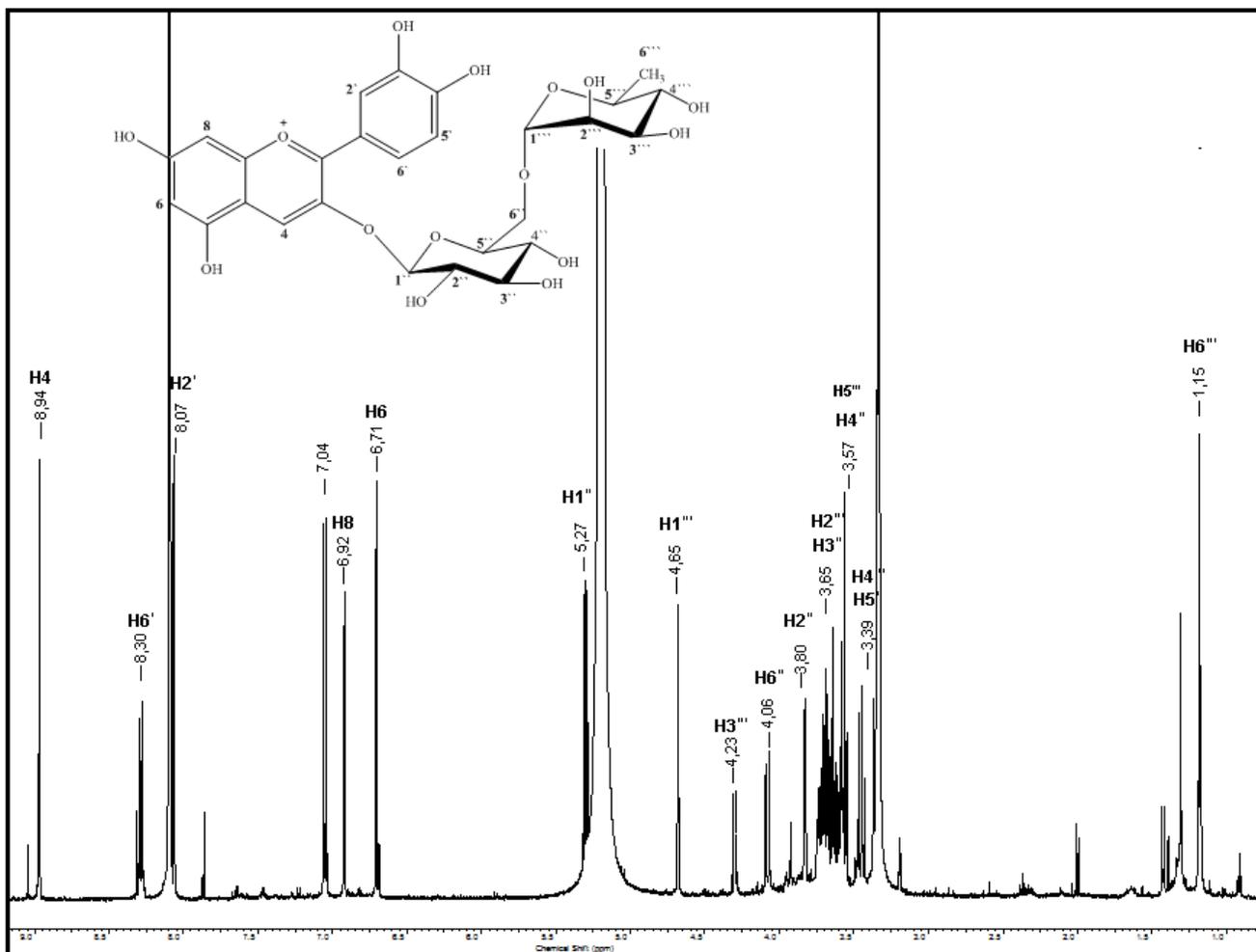
Figura 44. Estructura molecular de la antocianina 1.



El espectro RMN  $^1H$ , de la antocianina 1 (Figura 45, Tabla 12), mostró a campo bajo seis señales en  $\delta_H$  8.94 (s),  $\delta_H$  6.71 (d),  $\delta_H$  6.92 (dd),  $\delta_H$  8.07 (d),  $\delta_H$  7.04 (d) y  $\delta_H$  8.30 (dd) que confirman a la cianidina como aglicona<sup>151</sup>, sugerida por espectrometría de masas.

<sup>151</sup> ANDERSEN, F. Op. Cit. p. 67.

Figura 45. Espectro RMN  $^1\text{H}$  de la antocianina 1.



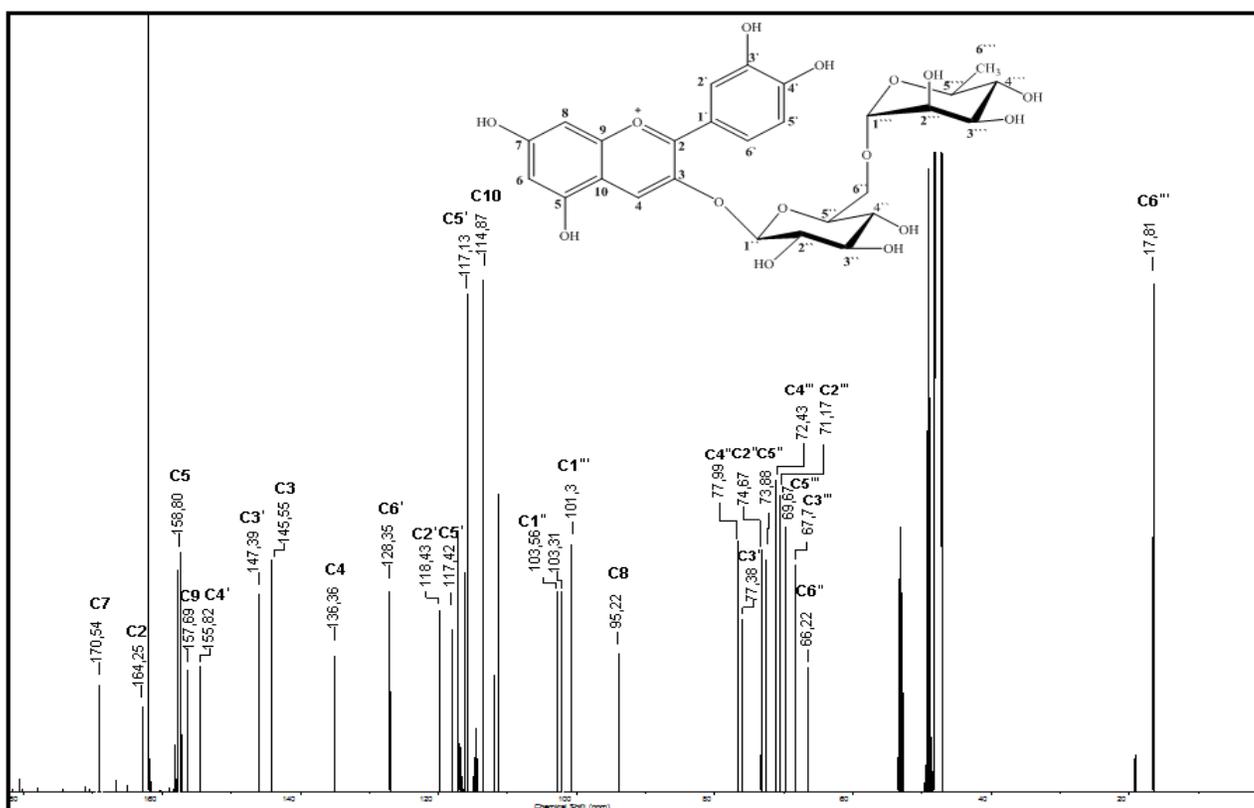
Del espectro RMN  $^1\text{H}$  se asignaron las señales en 8.97, 8.07, 7.04 y 8.30 ppm a los protones H-4, H-2', H-5' y H-6', que concuerdan con las correlaciones observadas en los espectros HSQC y HMBC. En el espectro HMBC (figura 48) se observa que el protón H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  8.96 ppm) correlaciona con los carbonos C-2 ( $\delta$  162.86 ppm), C-5 ( $\delta$  157.96 ppm) y C-9 ( $\delta$  156.30 ppm) a tres enlaces ( $^3J$ ); con el carbono C-3 ( $\delta$  144.32 ppm) a dos enlaces ( $^2J$ ) y con el carbono C-4 ( $\delta$  134.76 ppm) en el espectro HSQC (figura 47); por otra parte, el protón H6' ( $\delta_{\text{H}}$  8.28 ppm) interacciona con los carbonos C-5' ( $\delta$  117.30 ppm) y C-4' ( $\delta$  154.39 ppm) a dos ( $^2J$ ) y tres ( $^3J$ ) enlaces respectivamente; al igual que el protón C-2' ( $\delta_{\text{H}}$  8.06 ppm) correlaciona con los carbonos C-6' ( $\delta$  126.87 ppm), C-4' ( $\delta$  154.44 ppm) y C-2 ( $\delta$  163.52 ppm) a tres enlaces ( $^3J$ ) y con el carbono C-3' ( $\delta$  146.26 ppm) a dos enlaces ( $^2J$ ) y el protón H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  7.05 ppm) correlaciona con los carbonos C-1' ( $\delta$  119.93 ppm), C-3' ( $\delta$  146.47 ppm) y C-4' ( $\delta$  154.44 ppm). En la figura 50 se observa el espectro COSY donde

se puede determinar la correlación entre el protón H6' ( $\delta_H$  8.29 ppm) y los protones H2' ( $\delta_H$  8.06 ppm) y H5' ( $\delta_H$  7.04 ppm).

Además, en el espectro RMN  $^1H$  (figura 45) de la antocianina 1 se observan dos señales a  $\delta_H$  5.31 (d) y 4.68 (d), estos desplazamientos químicos son típicos para protones sobre carbonos anoméricos que evidencian la presencia de dos unidades de azúcar. Estas dos señales son dos dobletes que de acuerdo con la magnitud de la constante de acoplamiento indican la presencia de un enlace  $\beta$ -glicosídico y un enlace  $\alpha$ -glicosídico (Tabla 12).

De acuerdo con el desplazamiento químico y las constantes de acoplamiento, la antocianina 1 tiene en su estructura una unidad de glucosa y una unidad de ramnosa, aunque la asignación se logró realizando un análisis simultáneo de COSY, HSQC y HMBC.

Figura 46. Espectro  $^{13}C$  de la antocianina 1.



El espectro HSQC revela la correlación directa entre los protones H-1'' ( $\delta_H$  5.31 ppm) y H-1''' ( $\delta_H$  4.65 ppm) con sus respectivos carbonos anoméricos (102,31 ppm y 101,30 ppm respectivamente) (figura 47). La expansión de la región entre 3 y 4.5 ppm muestra la interacción de los protones H-2'' ( $\delta$  3.81/73.66 ppm), H-3'' ( $\delta$  3.72/76.24 ppm), H-4'' ( $\delta$

3.60/76.87 ppm), con sus respectivos carbonos, correspondientes a la glucosa, y adicionalmente, la interacción de los protones H-5''' ( $\delta$  3.59/68.33 ppm), H-2''' ( $\delta$  3.53/70.16 ppm) y H-4''' ( $\delta$  3.37/72.54 ppm) con sus carbonos, correspondientes a la ramnosa. Se puede confirmar la presencia de esta ramnosa por los protones del grupo metilo a  $\delta_H$  1.17 ppm que interaccionan con su respectivo carbono a 17.51 ppm.

De acuerdo al espectro HMBC (figura 49) las señales a  $\delta$  5,31/144,38 ppm determinan que una unidad de glucosa está enlazado con el carbono 3 de la aglicona. Igualmente, el protón anomérico de la unidad de ramnosa y el C-6'' a  $\delta$  4,69/66.24 ppm confirman el enlace entre la ramnosa y la unidad glucosídica.

Adicional a ello, también se evidencia interacciones entre el protón H-1''' ( $\delta_H$  4.65 ppm) con los carbonos C-4''' ( $\delta$  71.09 ppm) y C-5''' ( $\delta$  68.47 ppm) (figura 55); el protón H-5''' ( $\delta_H$  3.57 ppm) con C-4''' ( $\delta$  71.48 ppm) y el protón H-4''' ( $\delta_H$  3.36 ppm) con los carbonos C-5''' ( $\delta$  68.46 ppm) y C-6''' ( $\delta$  16.56 ppm). Se observa, además, correlaciones entre el protón H-6''' ( $\delta_H$  1.18 ppm) con los carbonos C-4''' ( $\delta$  71.26 ppm) y C-5''' ( $\delta$  68.08 ppm); el protón H-3'' ( $\delta_H$  3.57 ppm) de la glucosa interacciona con C-1'' ( $\delta$  102.31 ppm) y C-4'' ( $\delta$  76.41 ppm).

En el espectro COSY (figura 50) se evidencia que el protón anomérico H-1'' a  $\delta$  5,32 ppm (de la unidad de glucosa) interacciona con el protón a  $\delta$  3,67 ppm (H-3'') y a su vez este protón (H-3'') con el protón a  $\delta$  4,07 ppm (H-6''). Además, se observa una interacción del grupo metilo (de la unidad de ramnosa) en  $\delta$  1.17 ppm (H-6''') con el protón a 3,58 ppm (H-5''') que corrobora la existencia de estos dos azúcares.

Figura 47. Espectro HSQC de la antocianina 1.

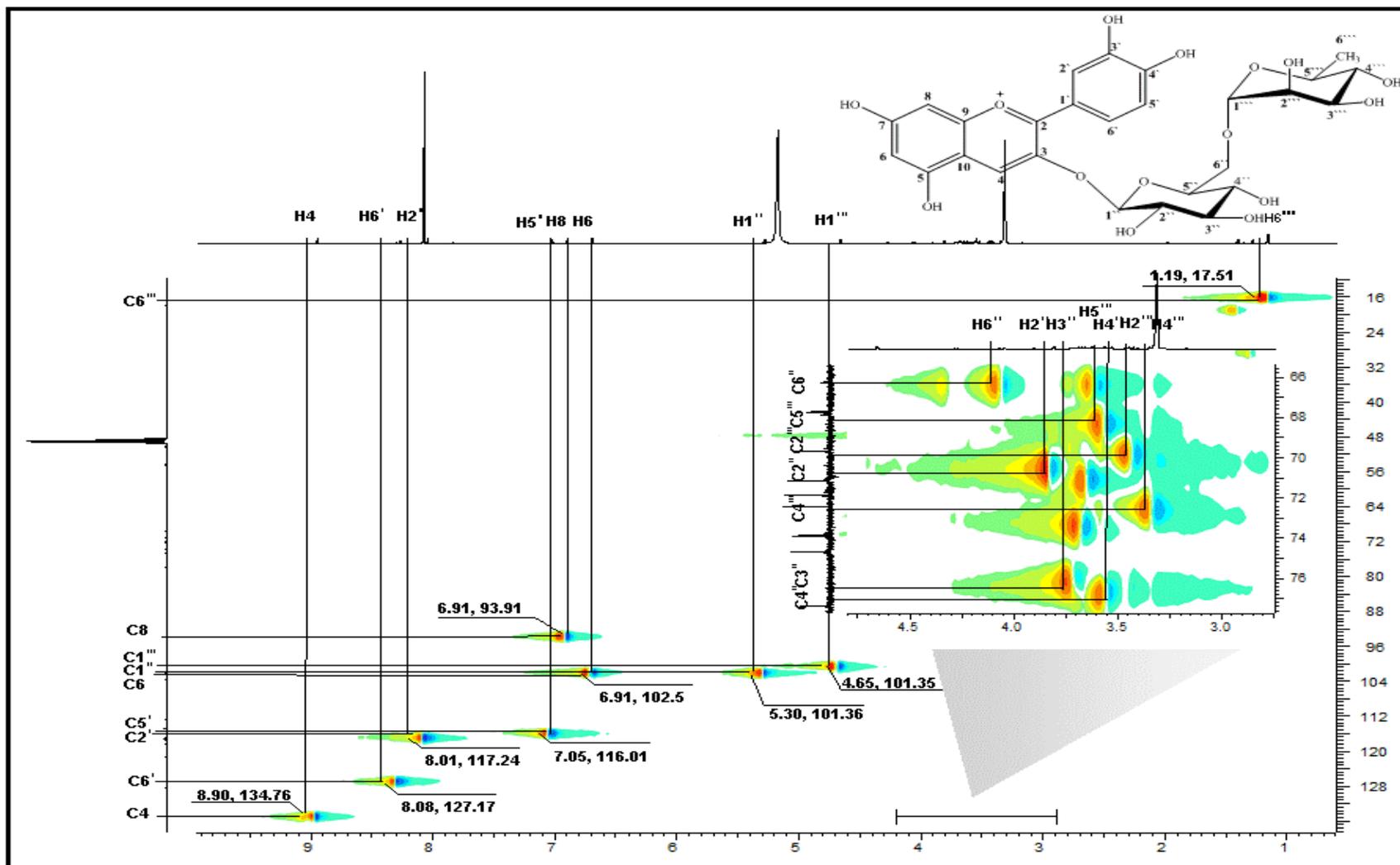


Figura 48. Expansión de la región aromática del espectro HMBC de la antocianina 1.

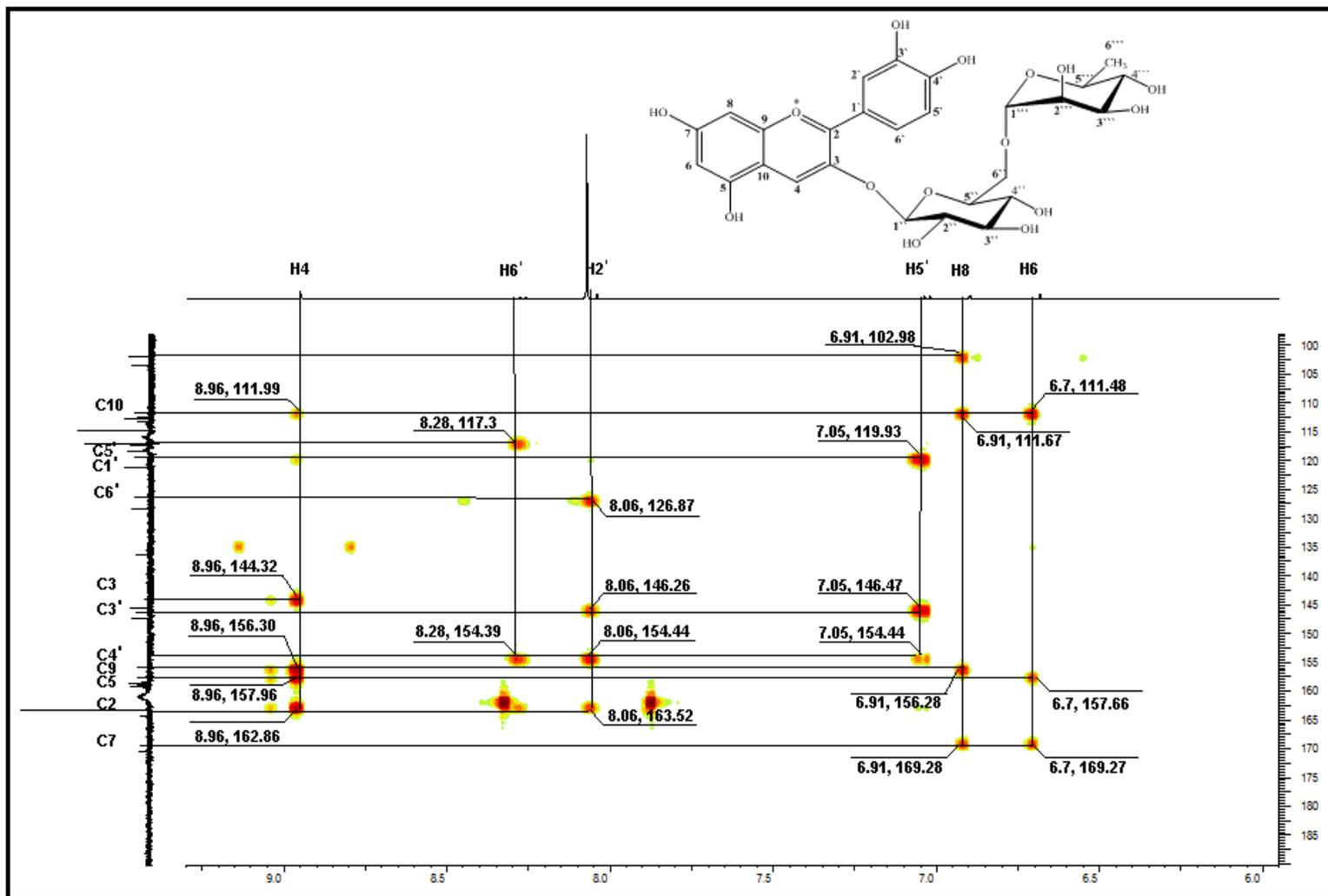


Figura 49. Expansión de la región alifática del espectro HMBC de la antocianina 1.

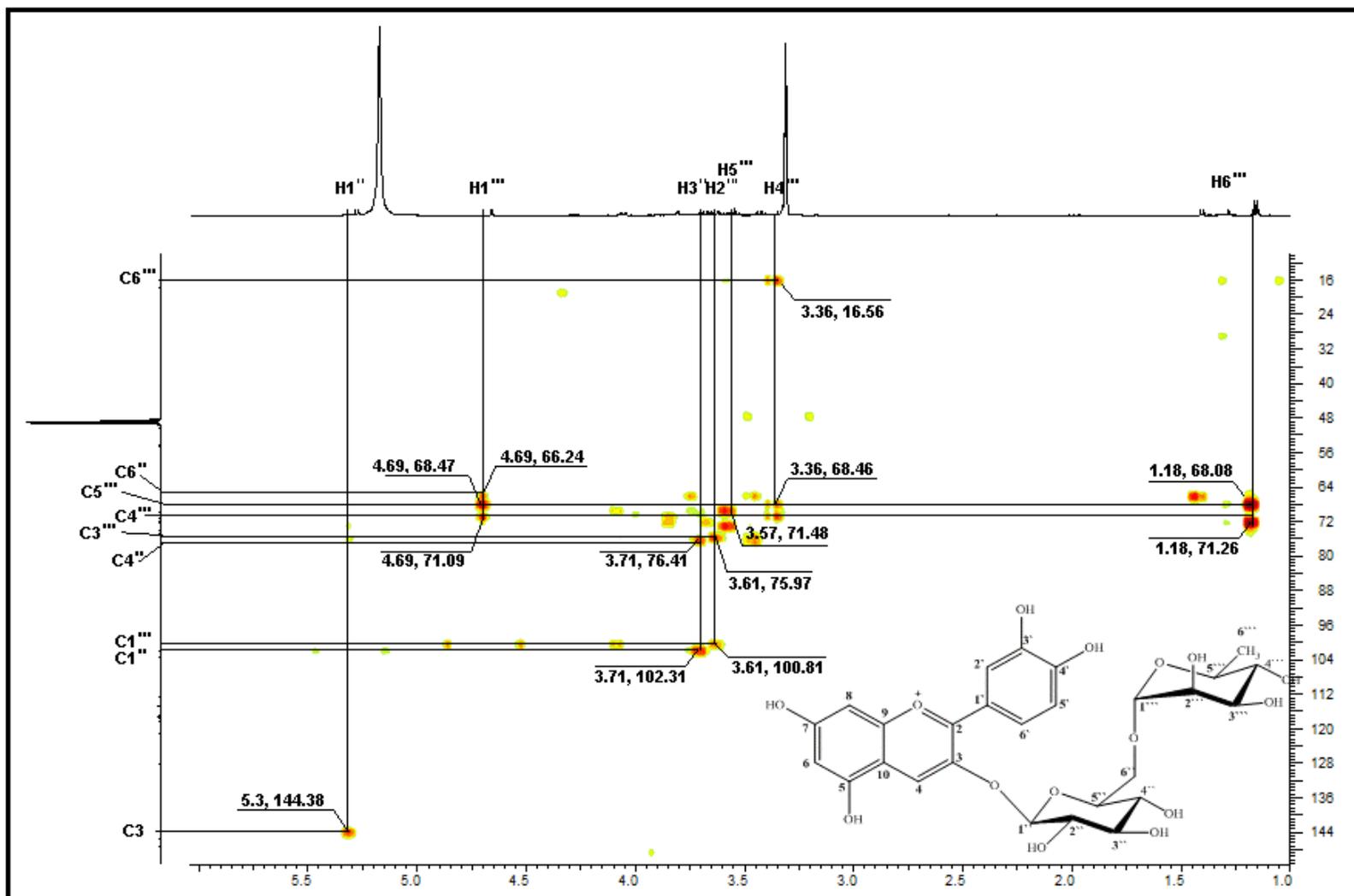
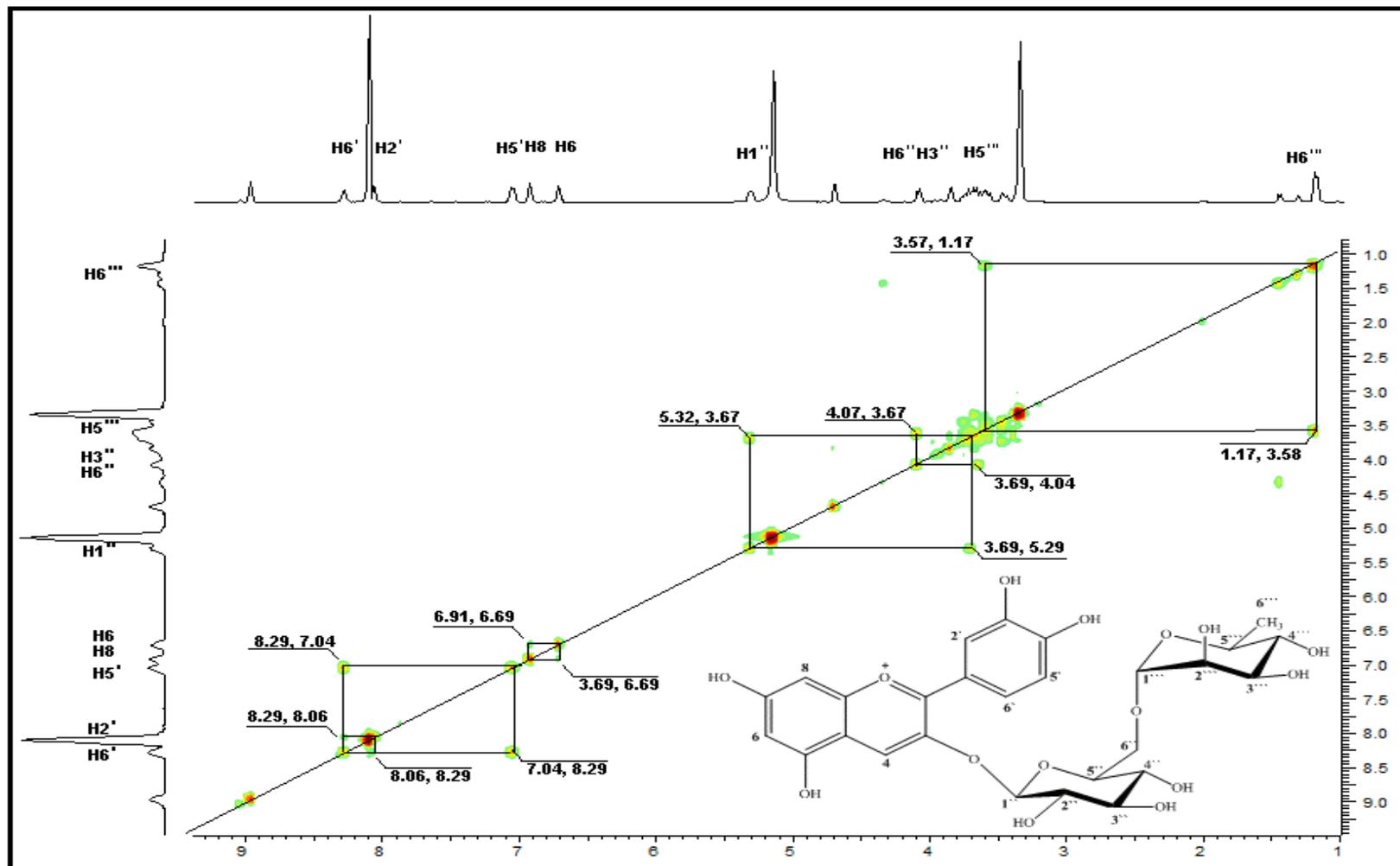


Figura 50. Espectro COSY de la antocianina 1.

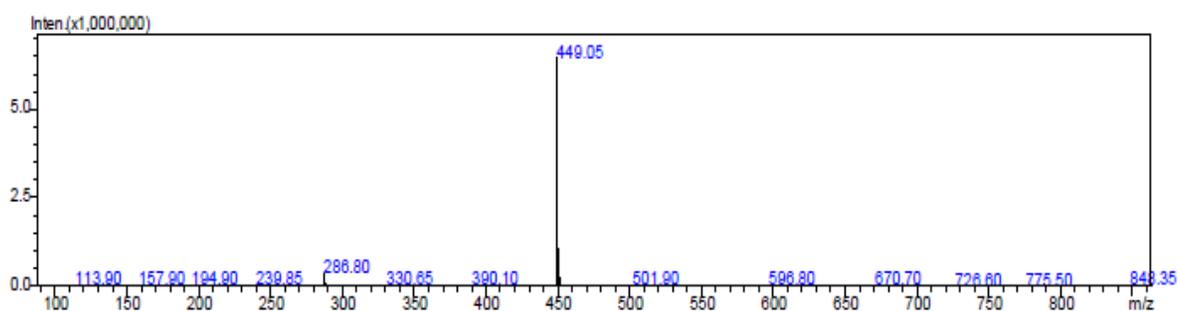


> Caracterización estructural de la antocianina 2

El espectro UV-VIS de la antocianina 2 muestra un máximo de absorción en 517 nm (Figura 41). El valor encontrado para la relación  $A_{400}/A_{\text{vis-máx}}$  es mayor que 32%, lo que sugiere que el pigmento presenta sustitución en la posición 3 de la aglicona. Al igual que la antocianina 1, en esta antocianina se descarta la presencia de grupos acilo por la ausencia de un máximo pronunciado en el intervalo de 310-335 nm.

El peso molecular de esta antocianina fue establecido con base en  $m/z$  449u del espectro ESI (Figura 51). El ión en  $m/z$  287 sugiere la presencia de una unidad de cianidina, cuya estructura posee en el anillo B dos grupos hidroxilo. Este ión  $[M-162u]$  se origina, posiblemente, por la pérdida de una subunidad de azúcar de 162u (glucosa).

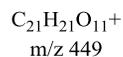
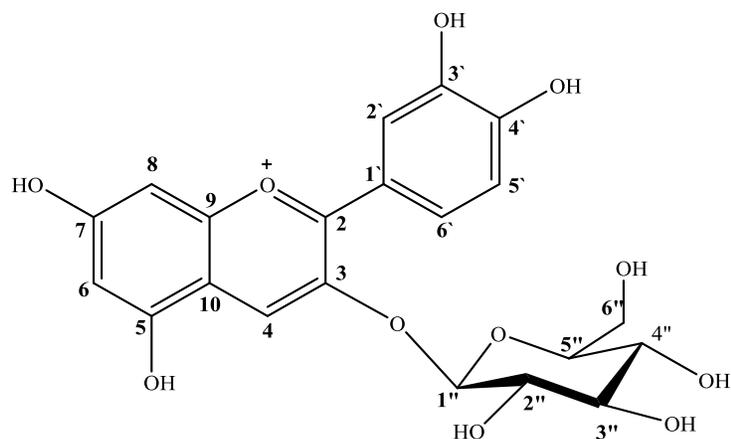
Figura 51. Espectro de masas de la antocianina monomérica 2.



De acuerdo con los resultados mencionados anteriormente se puede concluir que el compuesto aislado es una antocianina, por lo que se sugiere para la antocianina las siguientes características estructurales: a) el pigmento tiene como aglicona la cianidina, b) el pigmento no tiene en su estructura grupos acilo, c) la estructura del pigmento tiene una unidad de azúcar, d) existe sustitución en C3. Por lo anterior la estructura que se propone para la antocianina 2 es la cianidina-3-O-glucósido (Figura 52)<sup>152</sup>.

<sup>152</sup> PUNIT, B; Piya, P; Amit, K; Jayakumar, S; Pawan, G; Nayak, K; Priyadarsini, M. Radioprotection by quercetin-3-O-rutinoside, a flavonoid glycoside – A cellular and mechanistic approach. En: Journal of Functional Foods. Vol., 4 (2012); p. 924-932.

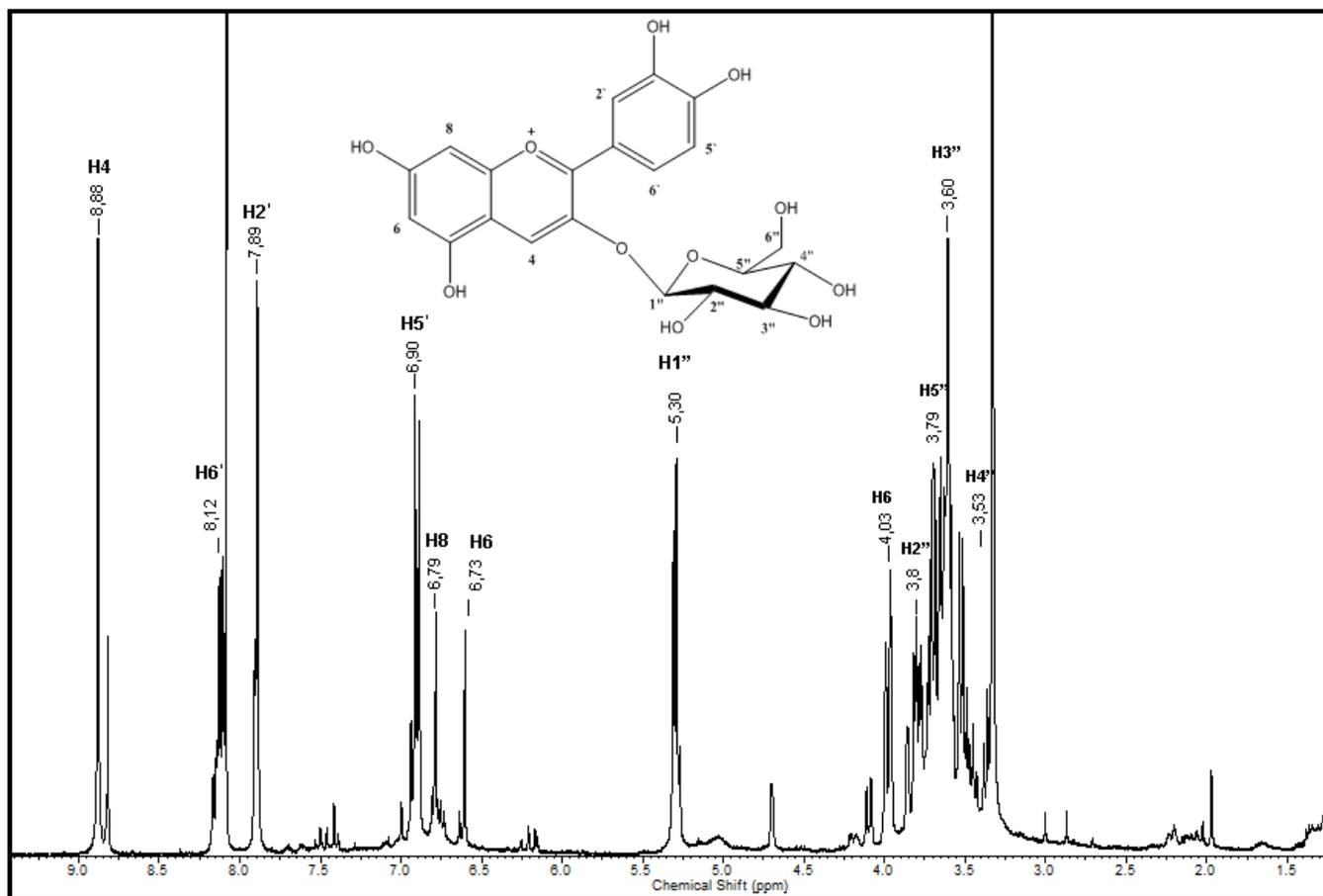
Figura 52. Estructura molecular de la antocianina 2.



El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la antocianina 2 (figura 53, tabla 12), mostró a campo bajo 6 señales en  $\delta_{\text{H}}$  8.88 (s),  $\delta_{\text{H}}$  6.66 (d),  $\delta_{\text{H}}$  6.79 (d),  $\delta_{\text{H}}$  7.89 (d),  $\delta_{\text{H}}$  6.90 (d) y  $\delta_{\text{H}}$  8.12 (dd) que están en concordancia con la aglicona cianidina<sup>153</sup>, sugerida a partir de espectrometría de masas. Las señales en 7.89, 6.90 y 8.12 ppm se asignaron a los protones H-2', H-5' y H-6', respectivamente, basado en sus constantes de acoplamiento (tabla 12); las señales en 7.89 y 6.90 ppm son dos dobletes con  $^4J_{\text{HH}}$  y  $^3J_{\text{HH}}$  de 2.26 y 8.70 Hz, respectivamente, mientras que la señal en 8.12 ppm es un doble doblete con un acoplamiento *meta* a H-2' ( $^4J_{\text{HH}} = 2.30$  Hz) y un acoplamiento *orto* a H-5' ( $^3J_{\text{HH}} = 8.73$  Hz), lo que demuestra que el anillo B está sustituido asimétricamente.

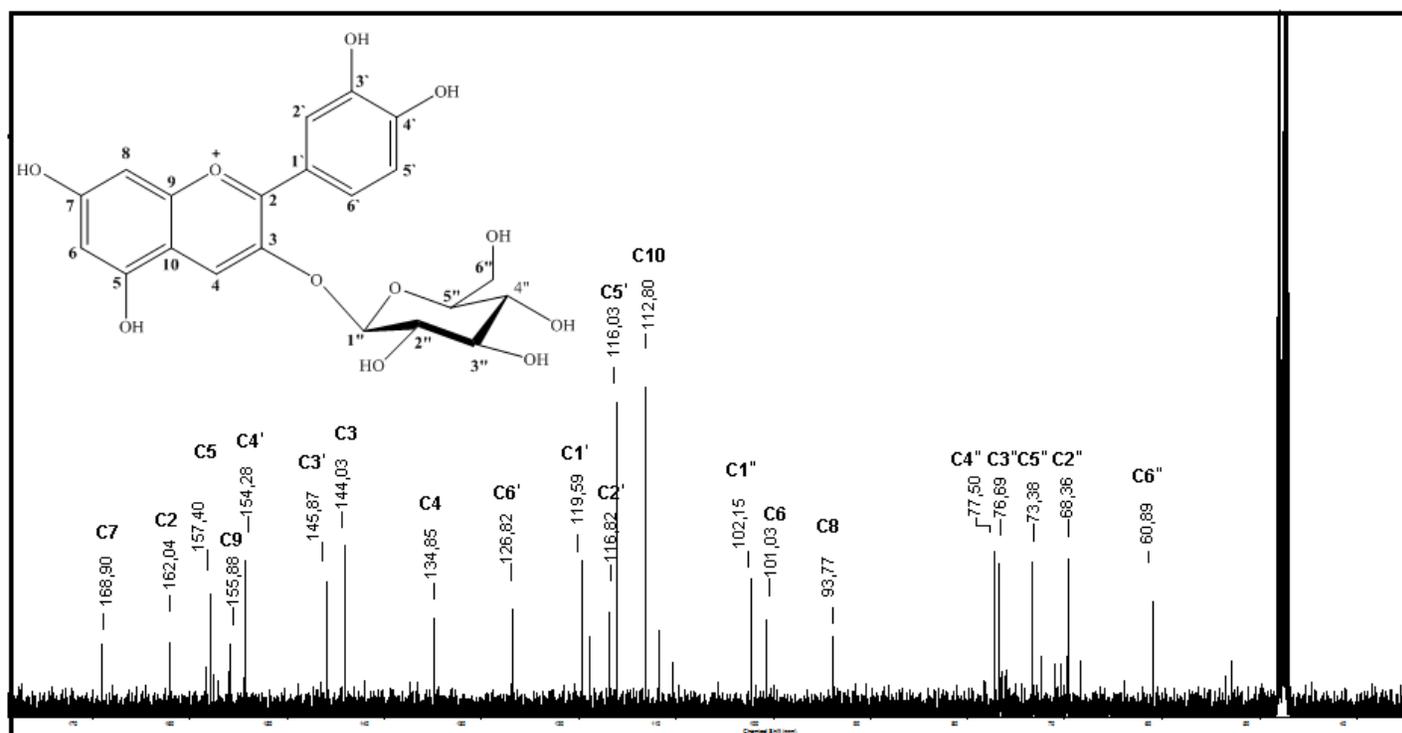
<sup>153</sup> ANDERSEN, F. Op. Cit. p. 67.

Figura 53. Espectro RMN  $^1\text{H}$  de la antocianina 2.



En la figura 54 se observa el espectro RMN  $^{13}\text{C}$  donde se asignaron las señales de los carbonos pertenecientes a la aglicona (tabla 13) por las correlaciones en el espectro HSQC que permitieron determinar la correlación directa de los carbonos con sus protones como se observa en la figura 55.

Figura 54. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de la antocianina 2.



Las señales para los protones H-2', H-5' y H-6' se corroboraron con ayuda de los espectros HSQC y HMBC. En el espectro HSQC se observa la correlación directa para el carbono C-6' ( $\delta$  126.53 ppm) y un doble doblete correspondiente a su respectivo protón H-6' ( $\delta_{\text{H}}$  8.12 ppm) (figura 47); mientras que el espectro HMBC se puede observar la interacción de este protón (H-6'  $\delta_{\text{H}}$  8.12 ppm) con los carbonos C-2 ( $\delta$  116.51 ppm) y C-4' ( $\delta$  154.5 ppm) a tres enlaces ( $^3J$ ) (figura 56). El protón H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  7.91 ppm) presentó correlación con los carbonos C-2 ( $\delta$  162.12 ppm) y C-4' ( $\delta$  154.41 ppm) ( $^3J$ ) y C-3' ( $\delta$  145.73 ppm) ( $^2J$ ) (figura 56) en el espectro HMBC; y con su respectivo carbono C-2' ( $\delta$  116.46 ppm) ( $^1J$ ) en el caso del espectro HSQC. Para el protón H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  6.92 ppm) se evidencia en el espectro HMBC correlaciones con los carbonos C-1' ( $\delta$  119.13 ppm) y C-3' ( $\delta$  145.97 ppm) a tres enlaces ( $^3J$ ) respectivamente (figura 48), y una correlación a un enlace ( $^1J$ ) con el carbono C-5' ( $\delta$  116.06 ppm) en el espectro HSQC (figura 55).

Figura 55. Espectro HSQC de la antocianina 2.

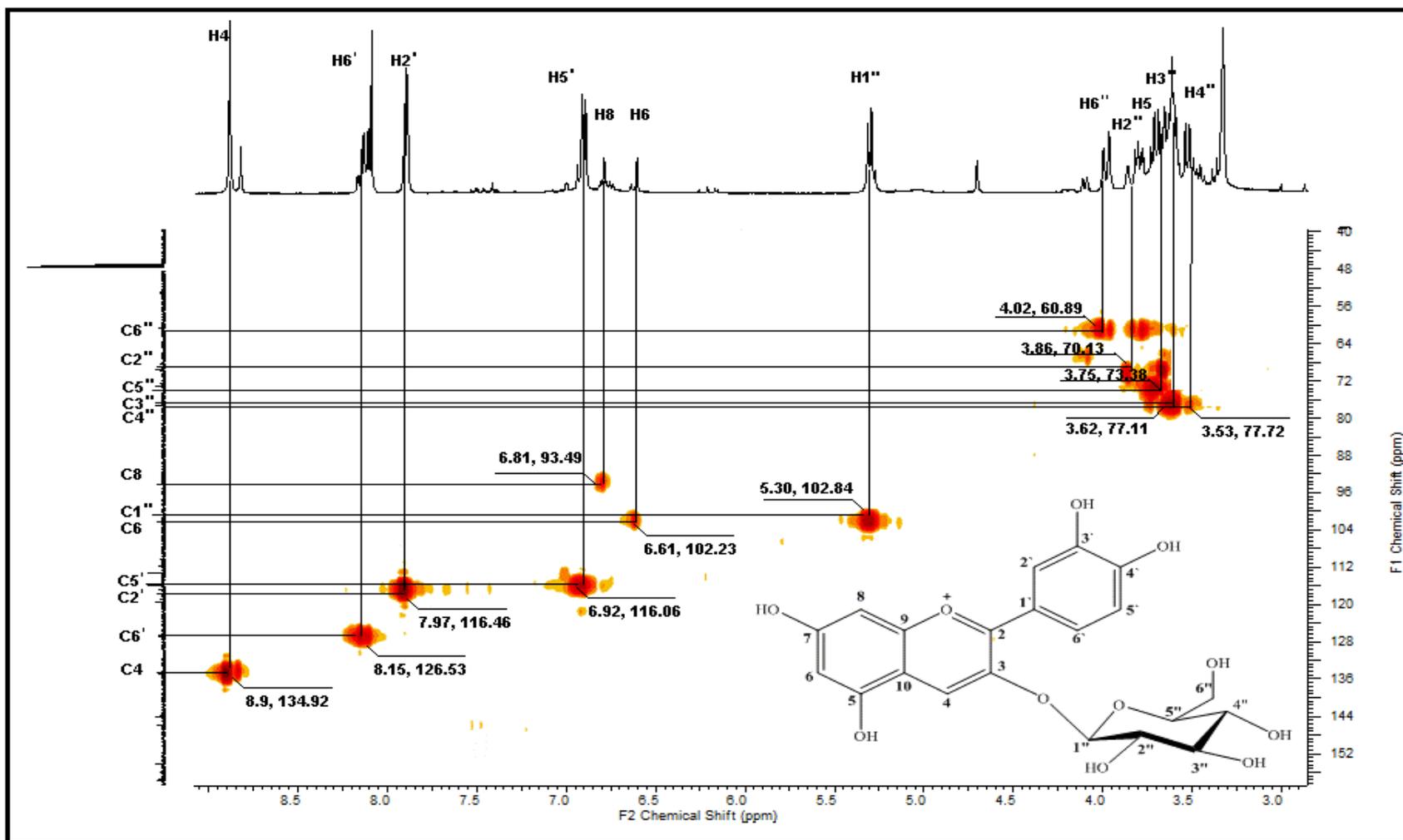
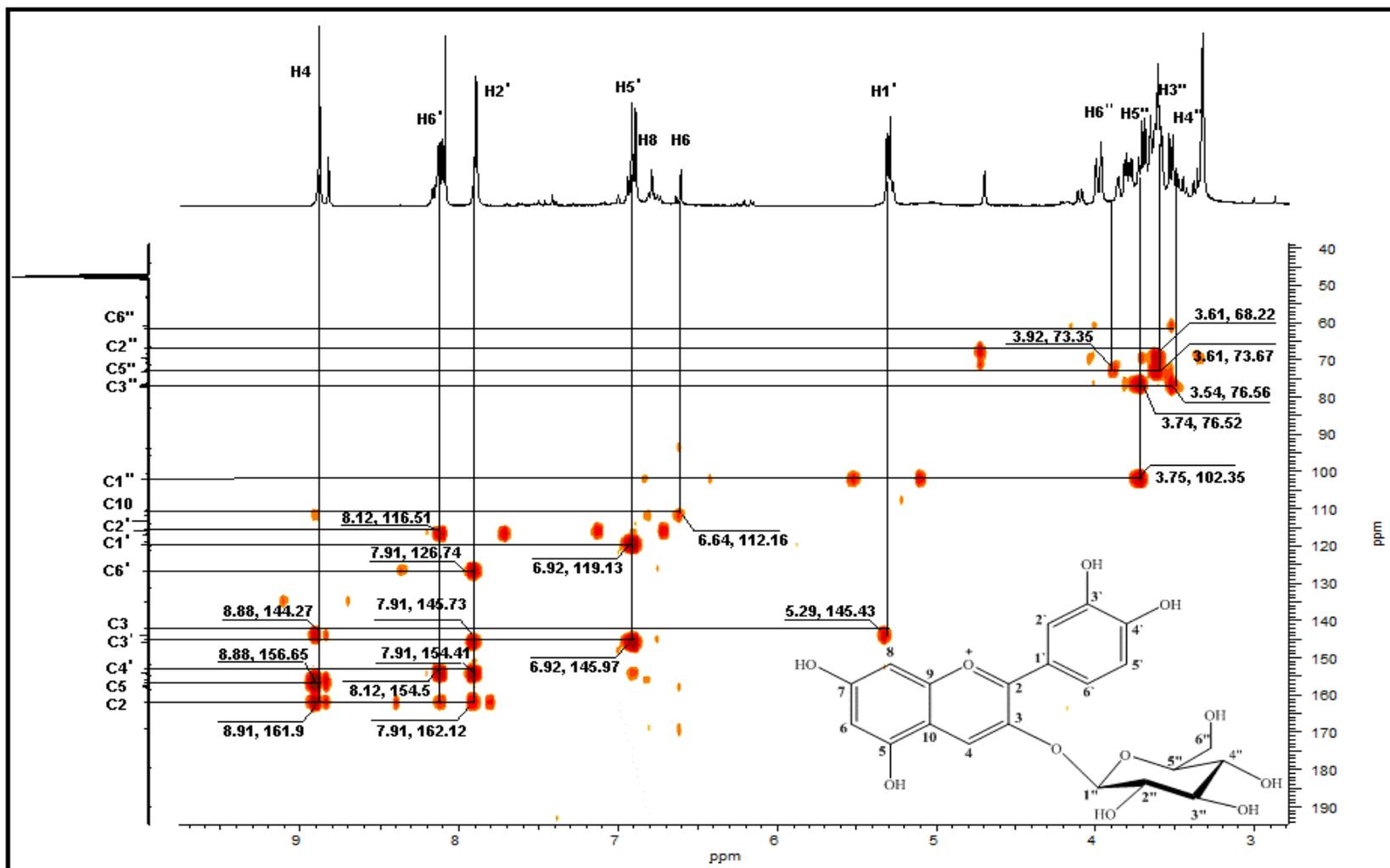


Figura 56. Espectro HMBC de la antocianina 2.



Un singlete en 8.88 ppm se asignó a H-4 (RMN  $^1\text{H}$ , figura 53), donde en el espectro HMBC se observa que este protón interacciona con los carbonos vecinales C-2 ( $\delta$  161.9 ppm) ( $^3\text{J}$ ), C-5 ( $\delta$  156.65 ppm) ( $^3\text{J}$ ) y C-3 ( $\delta$  144.27 ppm) ( $^2\text{J}$ ) (figura 56) y con su respectivo carbono C-4 ( $\delta$  134.92 ppm) ( $^1\text{J}$ ) observado en el espectro HSQC (figura 55).

En el espectro RMN  $^1\text{H}$  (figura 53) se observa además, una señal de hidrógeno a  $\delta_{\text{H}}$  5.30 (d) que fue asignado para el protón del carbono anomérico (H-1'') que demuestra la presencia de una unidad de azúcar. La configuración de un enlace  $\beta$ -glicosídico fue confirmada de acuerdo a la magnitud de su constante de acoplamiento (tabla 12). En el espectro HMBC (figura 56) se evidencia que este protón asignado como H-1'' correlaciona con el carbono C-3 ( $\delta$  145.43 ppm) ( $^3\text{J}$ ), lo que denota que esta unidad de azúcar se encuentra ligada a la posición 3 de la cianidina, siendo común esta posición de unión en la antocianinas. En el espectro HSQC (figura 55) se puede ver que este protón H-1'' correlaciona a un enlace ( $^1\text{J}$ ) con el carbono anomérico C-1'' ( $\delta$  102.84 ppm).

Con los espectros HSQC y HMBC se logró confirmar también las demás señales del azúcar. El protón H-5'' se asignó a 3.75 ppm en el espectro RMN  $^1\text{H}$  y se observa correlacionando con el carbono anomérico C-1'' ( $\delta$  102.35 ppm) ( $^2\text{J}$ ) y C-3'' ( $\delta$  76.52 ppm) ( $^2\text{J}$ ) en el espectro HMBC (figura 56); así mismo, se observa una correlación entre el protón H-3'' ( $\delta_{\text{H}}$  3.61 ppm) con el carbono C-2'' ( $\delta$  68.22 ppm) ( $^2\text{J}$ ) y C-5'' ( $\delta$  73.67 ppm) ( $^3\text{J}$ ) y el protón H-4'' ( $\delta_{\text{H}}$  3.54 ppm) con el carbono C-3'' ( $\delta$  76.56 ppm) ( $^3\text{J}$ ) y el carbono C-6'' ( $\delta$  60.42 ppm) ( $^3\text{J}$ ). El protón H-6'' presentó una correlación con el carbono C-5'' ( $\delta$  73.35 ppm) a dos enlaces ( $^2\text{J}$ ).

Tabla 12. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  para las antocianinas 1 y 2 de RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$  en ppm,  $J$  en Hz). MeOH-d4.

<i>Protones</i>	<i>1</i>	<i>2</i>
<i>Aglicona</i>		
4	8.94, s	8.88, s
6	6.71, d 2.06	6.66, d 1.90
8	6.92, d 2.01	6.79, d 2.02
2'	8.04, d 2.40	7.89, d 2.26
5'	7.04, d 8.74	6.90, d 8.72
6'	8.30, dd 8.74, 2.23	8.12, dd 8.73, 2.30
<i>3-O-glucósido</i>		
1''	5.27 d 7.54	5.30 d 7.82
2''	3.80 dd 9.09, 7.89	3.80 dd 9.02, 7.89
3''	3.65-3.70 t 9.26	3.60 t 9.46
4''	3.57-3.60 m	3.55 dd 9.40, 7.61
5''	3.39-3.44 m	3.79 m
6''B	4.06 dd 11.14, 1.54	4.01 dd 11.14, 2.04
<i>6''-O-ramnósido</i>		
1'''	4.65 d 1.54	
2'''	3.6 m	
3'''	4.23-4.31 m	
4'''	3.36 m	
5'''	3.57 dd 9.09, 7.89	
6'''	1.15 d 6.34	

Tabla 13. Desplazamientos químicos del espectro RMN <sup>13</sup>C para las antocianinas 1 y 2 (δ en ppm). MeOH-d4.

C	1	2
<i>Aglicona</i>		
2	163.31	162.04
3	147.39	144.03
4	136.36	134.85
5	158.80	157.40
6	103.56	101.03
7	170.54	168.97
8	95.22	93.77
9	157.69	155.88
10	112.61	113.80
1'	119.39	119.59
2'	118.43	116.82
3'	145.55	145.87
4'	155.82	154.28
5'	117.42	116.03
6'	128.35	126.82
<i>3-O-glucósido</i>		
1''	103.31	102.15
2''	74.67	68.36
3''	77.38	76.69
4''	77.99	77.50
5''	73.88	73.38
6''	66.22	60.89
<i>6''-O-ramnósido</i>		
1'''	101.3	
2'''	71.17	
3'''	67.70	
4'''	72.43	
5'''	69.67	
6'''	17.81	

#### 4.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO TEAC.

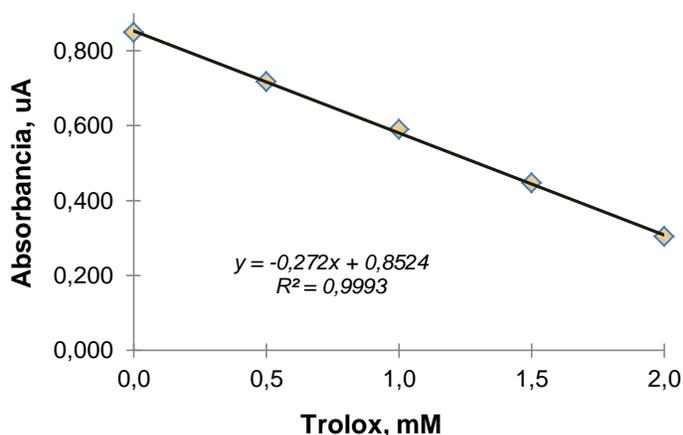
El oxígeno molecular ( $O_2$ ) juega un papel importante en la supervivencia de todo organismo aerobio, debido a su labor como aceptor final de electrones. Pero, por su naturaleza química, puede llegar a ser tóxico. De él se derivan radicales libres, que reaccionan rápida e inespecíficamente con la mayoría de los constituyentes celulares, ocasionando daños permanentes en su estructura. Adicionalmente, estos radicales pueden provocar efectos negativos en la composición y textura de diferentes productos (alimentos, cosméticos, etc).

Una alternativa en el sector alimenticio para prevenir la formación de los radicales libre o impedir su acción es la adición de antioxidantes a las materias primas y/o alimentos elaborados, con el fin de conservar las características organolépticas de los alimentos y brindar una alternativa más saludable a los consumidores.

Para evaluar la capacidad de captura de radicales libres se utilizó el procedimiento desarrollado por Re (1999)<sup>154</sup>, ya que es un método validado por su estabilidad y reproducibilidad. Esta metodología es una de las más adecuadas para el caso de muestras coloridas, como lo son los extractos de interés en este trabajo.

Se empleó patrones de trolox para construir una recta de calibrado (figura 57), donde se observa la relación lineal entre la absorbancia y la concentración de trolox. La pendiente negativa indica la decoloración que sufre el catión radical ABTS al reaccionar con una sustancia antioxidante (trolox). Las mediciones se realizaron por triplicado.

Figura 57. Recta de calibrado para el método TEAC.



<sup>154</sup> RE, R; Pellegrini, N; Proteggente, A; Pannala, A; Yang, M. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *En: Free Rad. Biol. Med. Vol., 26 (1999); p. 1231-1237.*

Posteriormente, bajo la misma metodología se midió por triplicado la absorbancia de soluciones acuosas de las antocianinas aisladas y de los extractos EC y EP (antioxidantes) (tabla 14).

Tabla 14. Datos de absorbancia de los extractos EC, EP y las dos antocianinas obtenidas por HPLC preparativa.

<i>Réplica</i>	<i>Absorbancia</i>			
	<i>EC</i>	<i>EP</i>	<i>Antoc 1</i>	<i>Antoc 2</i>
1	0,706	0,429	0,741	0,721
2	0,710	0,425	0,741	0,720
3	0,705	0,423	0,741	0,721
<i>Promedio</i>	0,707	0,425	0,741	0,721
<i>DE</i>	0,003	0,003	0,000	0,001
<i>CV</i>	0,360	0,685	0,051	0,028

A partir de la tabla 14, y mediante la ecuación de la recta de calibrado se obtuvieron los valores de la capacidad equivalente a Trolox (TEAC) para todos los extractos (Tabla 15).

Tabla 15. Capacidad antioxidante de los extractos EC, EP y las dos antocianinas aisladas por HPLC preparativa.

<i>Muestra</i>	<i>TEAC</i>		<i>% Inhibición</i>
	<i>Experimental</i>	<i>Reportado</i>	
Ácido Ascórbico	0,99 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,05 ± 0,03 <sup>155</sup> 0,99 ± 0,04 <sup>156</sup>	49,29
EC	17,56 ± 0,31 <sup>b</sup>	-	19,94
EP	87,39 ± 0,59 <sup>b</sup>	-	51,82
Antoc 1	1,44 ± 0,98 <sup>a</sup>	-	18,35
Antoc 2	0,92 ± 0,57 <sup>a</sup>	-	16,07

<sup>a</sup> mmol Trolox / mmol de compuesto; <sup>b</sup> μmol Trolox / g fruta.

En la tabla 15, se observa los valores TEAC experimentales obtenidos para los extractos de estudio. Con el fin de evaluar experimentalmente la funcionalidad del método, se determinó la eficiencia antiradical del antioxidante de referencia ácido ascórbico, este

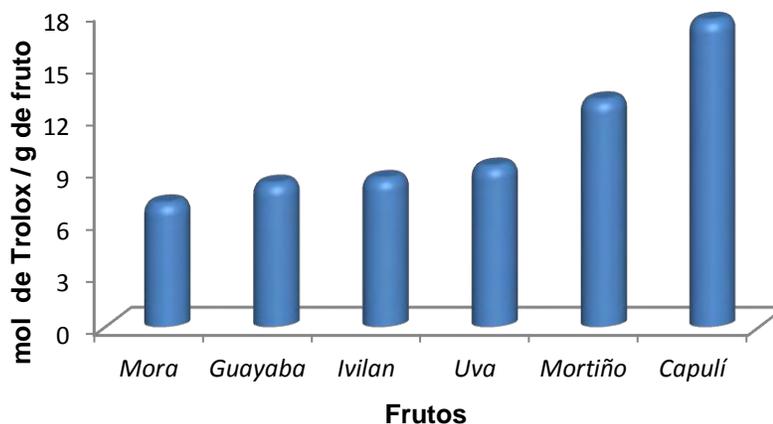
<sup>155</sup> RE, R. Op. Cit. p. 56.

<sup>156</sup> VAN DEN BERG, R.; Haenen, G. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of fruits. *En: Food Chemistry*. Vol., 66 (1999); p. 511-517.

presentó un valor TEAC que concuerda con los datos publicados en la literatura, siendo este muy buen antioxidante ya que presenta en su estructura molecular, grupos con propiedades reductoras, puesto que puede ceder fácilmente electrones a través de sus grupos hidroxilo y estabilizarse mediante el sistema conjugado que presenta la molécula; este mismo mecanismo de captura radicalaria son las que caracterizan a los polifenoles, siendo considerados también buenos antioxidantes.

El extracto EP mostró mayor capacidad para capturar el radical ABTS, esto puede estar relacionado con el mayor contenido de polifenoles en este extracto, producto del enriquecimiento mediante cromatografía en columna (Amberlita XAD-7). Sin embargo, el valor TEAC para el extracto EC del fruto de Capulí ( $17,56 \pm 0,30$ ) es considerablemente mayor que el reportado para otras frutas como la mora ( $7,10 \pm 0,22$ ), guayaba ( $8,23 \pm 0,40$ ), uva ( $9,21 \pm 0,20$ ), ivilan ( $8,50 \pm 0,07$ ) y mortiño ( $13,33 \pm 0,41$ ), como se observa en la figura 46, evidenciando que este fruto podría tener potenciales beneficios para la salud humana.

Figura 58. Comparación de la capacidad antioxidante TEAC del fruto de Capulí con otros frutos.



#### 4.6 ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS EXTRACTOS EC Y EP.

Como se mencionó anteriormente, una de las principales limitantes de uso de este tipo de extractos como aditivo para alimentos es su estabilidad a condiciones ambientales. En este trabajo se evaluó la estabilidad de los extractos frente a variaciones de pH en presencia y ausencia de luz y en presencia y ausencia de aire, durante un periodo de almacenamiento de 3 meses.

#### 4.6.1 Determinación de los parámetros cinéticos de degradación para los extractos EC y EP.

Para el estudio de la estabilidad de este tipo de extractos se implementó la metodología publicada por Janna<sup>157</sup>. Se prepararon soluciones acuosas de cada uno de los extractos así: EC (0,5% p/v) y EP (0,2% p/v). Porciones de estas soluciones se sometieron a almacenamiento (temperatura ambiente) a diferentes valores de pH (pH 3 y 5) y en presencia y ausencia de luz, y en presencia y ausencia de aire. La combinación y notación de estas variables se presentan en la tabla 16. Cada condición se evaluó por triplicado.

Tabla 16. Notación y combinación de las diferentes variables utilizadas para el estudio de la estabilidad de las muestras.

<i>Condición de almacenamiento</i>	<i>Notación</i>
Con aire, con luz	1
Con aire, sin luz	2
Sin aire, con luz	3
Sin aire, sin luz	4

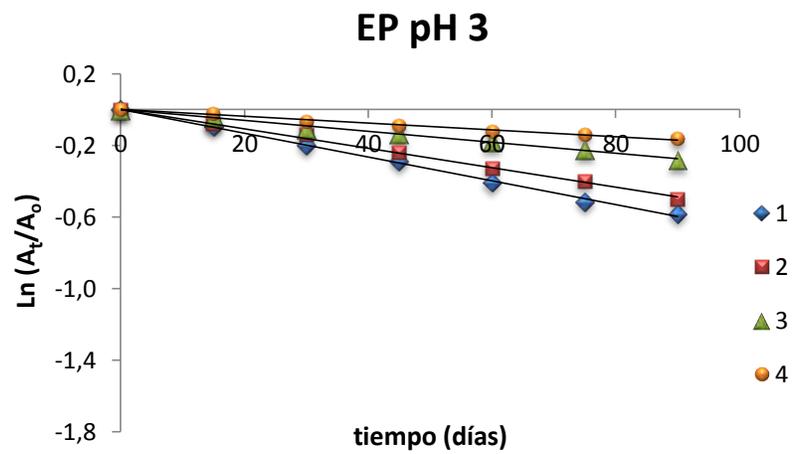
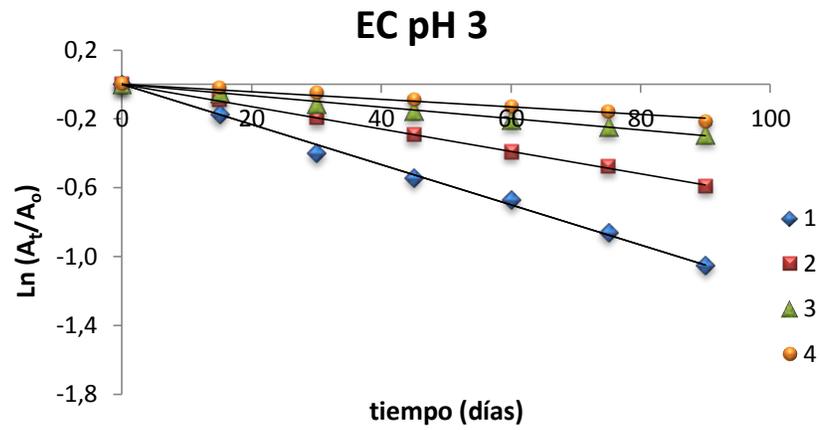
En la figura 59 se presenta el comportamiento de la variable  $\ln(A_t/A_0)$  con respecto al tiempo (donde  $A_0$  es la absorbancia inicial de la solución acuosa a la longitud de onda máxima y  $A_t$  la absorbancia en un tiempo  $t$  en días) de las muestras EC y EP almacenadas a pH 3 y 5, bajo las condiciones mostradas en la tabla 15. Se puede observar que el proceso de degradación de las antocianinas, se ajustó a una cinética de primer orden. La constante de velocidad de reacción ( $K$ ) y tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), se calculó por medio de las siguientes ecuaciones:

$$\ln\left(\frac{A_t}{A_0}\right) = -k * t \quad ; \quad t_{1/2} = -\ln 0,5 / k$$

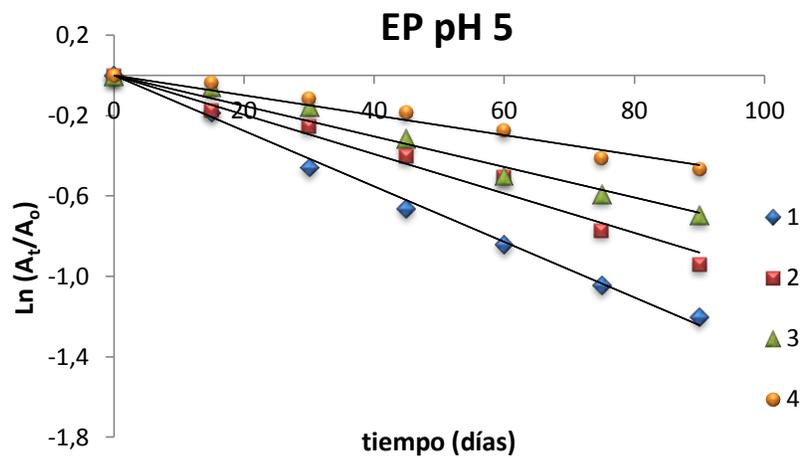
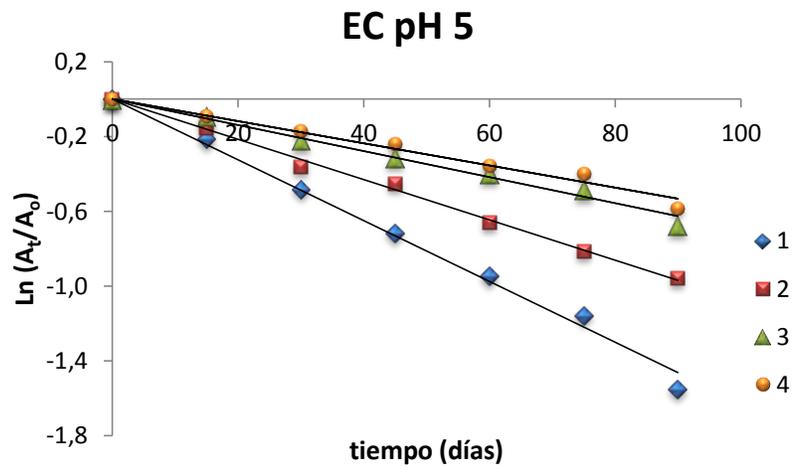
<sup>157</sup> JANNA, O. Op. Cit. 58.

Figura 59. Comportamiento cinético del proceso de degradación de soluciones acuosas de EC y EP.

a. Almacenamiento a pH 3.



b. Almacenamiento a pH 5.



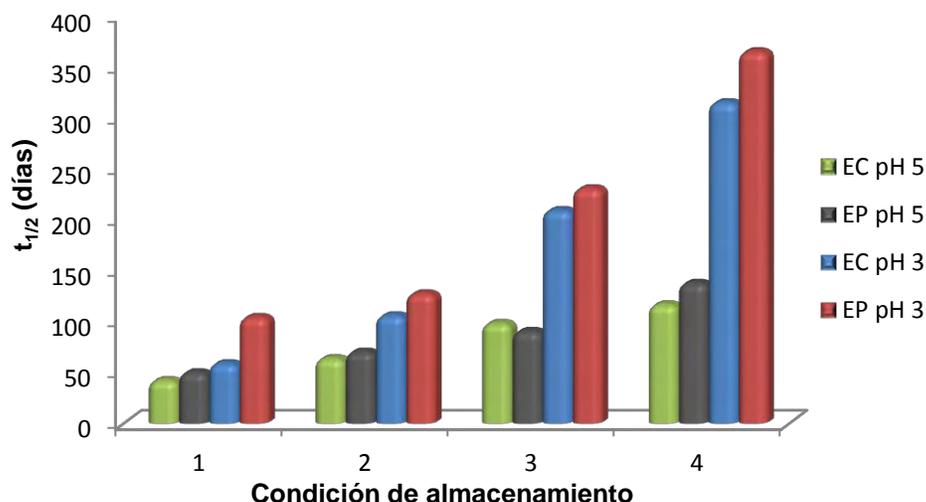
En la tabla 17 se presentan las constantes cinéticas del proceso de degradación (velocidad de degradación y tiempo de vida media) de las soluciones acuosas de los extractos EC y EP.

Tabla 17. Parámetros cinéticos de degradación de antocianinas para los extractos EC y EP en diferentes condiciones de almacenamiento.

<i>Condiciones de Almacenamiento</i>			<i>Resultados</i>	
<i>Extracto</i>	<i>pH</i>	<i>Condición</i>	<i>t<sub>1/2</sub> (días)</i>	<i>k (10<sup>-3</sup> días<sup>-1</sup>)</i>
EC	3	1	59,24 ± 0,90	11,67 ± 0,06
		2	106,64 ± 1,35	6,51 ± 0,05
		3	209,79 ± 3,95	3,30 ± 0,12
		4	315,06 ± 10,53	2,19 ± 0,06
	5	1	42,52 ± 0,21	16,26 ± 0,34
		2	64,18 ± 0,54	10,76 ± 0,49
		3	99,02 ± 0,06	6,97 ± 0,87
		4	117,48 ± 0,27	5,91 ± 0,12
EP	3	1	105,02 ± 0,40	6,65 ± 0,38
		2	128,36 ± 0,58	5,44 ± 0,45
		3	231,05 ± 0,45	3,05 ± 0,98
		4	364,81 ± 0,98	1,92 ± 0,87
	5	1	50,23 ± 0,82	13,80 ± 0,48
		2	70,72 ± 0,74	9,79 ± 0,45
		3	91,20 ± 0,32	7,59 ± 0,89
		4	138,63 ± 0,48	4,95 ± 0,57

Los resultados de la tabla 17, se pueden observar más claramente en la figura 60. En esta figura se presenta la variación del tiempo de vida media de los extractos EC y EP con respecto a las diferentes condiciones de almacenamiento.

Figura 60. Variación de los tiempos de vida media de los extractos EP y EC con respecto a las diferentes condiciones de almacenamiento.



El análisis de estos datos permite concluir que bajo las diferentes condiciones de almacenamiento, el tiempo de vida media de los dos extractos (EC y EP) es mayor (mayor estabilidad) cuando las soluciones acuosas se almacenan en el valor de pH más bajo (pH 3) (tabla 17). Esto está en concordancia con publicaciones previas sobre la estabilidad de este tipo de compuestos<sup>158,159</sup>.

Además, si se observa el efecto combinado del aire y la luz sobre la cinética de degradación, es evidente que estos son los factores que más influyen en los procesos de degradación de este tipo de extractos. Se puede evidenciar que los extractos almacenados en ausencia de aire y luz (condición 4) presentan una menor velocidad de degradación (K) y un mayor tiempo de vida media. Por el contrario cuando las soluciones acuosas se almacenan en presencia de aire y luz (condición 1) éstas se degradan más rápidamente con respecto a las demás condiciones. Es claro, además, que el aire es el factor que más afecta la estabilidad de los extractos; cuando éstos se almacenan en presencia de aire y ausencia de luz (condición 2) tienen un tiempo de vida mayor que los extractos almacenados en ausencia de aire y ausencia de luz (tabla 17).

Estos resultados permiten además concluir que bajo las mejores condiciones de almacenamiento (pH 3 y en ausencia de aire y luz) el extracto purificado (EP) es más

<sup>158</sup> JANNA, O. Op. Cit. 58.

<sup>159</sup> CISNEROS, L; Cevallos, B. Stability of Anthocyanins-bases aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *En: Food Chemistry*. Vol., 86 (2004); p, 72-76.

estable que el extracto crudo (EC). Se deduce entonces que compuestos diferentes a los polifenoles, presentes en el extracto crudo, aceleran los procesos de degradación de las antocianinas.

#### 4.6.2 Encapsulamiento del extracto EP

La técnica de encapsulamiento ha sido ampliamente investigada en muchas aplicaciones de la industria farmacéutica y alimentaria, mejorando la estabilidad y biodisponibilidad de un producto. El concepto de encapsulación se ha fundamentado en la incorporación de un recubrimiento polimérico, la cual forma un ambiente capaz de controlar su interacción con el exterior.

El alginato es uno de los polímeros más empleados para ello, ya que forma una matriz altamente versátil, biocompatible y no tóxica<sup>160</sup>, para la protección de componentes activos, que pueden ser susceptibles a la degradación frente a factores adversos como aire o luz.

En este sentido, y con el ánimo de evaluar el efecto de la luz y el aire sobre la estabilidad del extracto purificado (EP) cuando la solución se encapsula en alginato de sodio, se realizaron ensayos siguiendo la metodología propuesta por Santos<sup>161</sup>. Se preparó una solución acuosa del EP (0,2% p/v, pH 3) y posteriormente se procedió a su encapsulación. Las capsulas se almacenaron en presencia de aire y luz durante 45 días, realizando mediciones periódicas de absorbancia durante este periodo de tiempo (figura 61).

De los resultados se puede deducir que la luz y el aire no afectan significativamente la estabilidad de la solución acuosa del extracto, los parámetros cinéticos de degradación son comparables con el extracto EP almacenado a pH 3 en ausencia de luz y aire (condición 1). Se puede concluir que este proceso protege a las antocianinas de los diferentes factores de degradación (aire y luz).

---

<sup>160</sup> SHAHIDI, F; Han, X. Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews. En: Food Science and Nutrition*. Vol., 33 (1993); p. 501-547.

<sup>161</sup> SANTOS, D. Op. Cit. p. 45.

Figura 61. Resultados obtenidos del almacenamiento del extracto EP encapsulado.

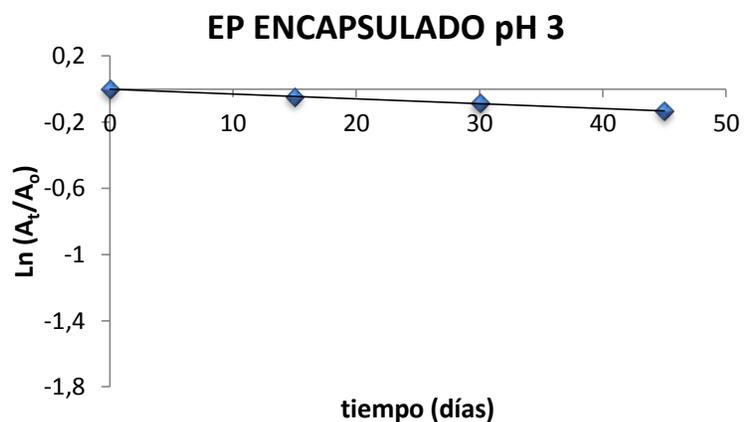


Tabla 18. Parámetros cinéticos de degradación de antocianinas para los extractos EC y EP a diferentes condiciones de almacenamiento.

<i>Condición de Almacenamiento</i>			<i>Resultados</i>	
<i>Extracto</i>	<i>pH</i>	<i>Condición</i>	<i>t<sub>1/2</sub></i> <i>(días)</i>	<i>k</i> <i>(10<sup>-3</sup> días<sup>-1</sup>)</i>
EP	3	con aire con luz	235,68	2,94

## CONCLUSIONES

- Se identificó la cianidina-3-O-(6''-O- $\alpha$ -ramnopiranosil)- $\beta$ -glucopiranosido y cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranosido como las antocianinas mayoritarias presentes en la cáscara del fruto de Capulí (*Prunus serotina* spp capuli (Cav) Mc. Vaug Cav). La concentración de antocianinas fue de  $47,38 \pm 0,13$  mg de Cianidina -3-glucósido / 100 g de fruta. De acuerdo a estos datos, el fruto en estudio podría ser una potencial fuente de pigmentos para su uso como aditivo de alimentos.
- El extracto purificado (EP) mostró mayor capacidad para capturar el radical ABTS, esto puede estar relacionado con el mayor contenido de polifenoles en este extracto producto del enriquecimiento mediante cromatografía en columna (Amberlita XAD-7).
- La capacidad antioxidante (TEAC) para el extracto EC del fruto de Capulí ( $17,56 \pm 0,30$   $\mu$ mol Trolox / g fruta) es mayor que el reportado para otras frutas como la mora ( $7,10 \pm 0,22$ ), guayaba ( $8,23 \pm 0,40$ ), uva ( $9,21 \pm 0,20$ ), ivilan ( $8,50 \pm 0,07$ ) y mortiño ( $13,33 \pm 0,41$ ).
- La degradación de las antocianinas del fruto en medio acuoso describen una cinética de reacción de primer orden. Los valores de la constante de velocidad de reacción y el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) evidencian una gran influencia del tipo de extracto, pH, luz y aire sobre su estabilidad.
- Se muestra claramente que el  $t_{1/2}$  es mayor cuando los extractos (EC y EP) se almacenan en condiciones más ácidas (pH 3.0). De igual forma se puede concluir que en ambos valores de pH las muestras son más estables cuando se almacenan en ausencia de aire y luz. El factor que más influye en la degradación de este tipo de extractos es el aire.
- Fue posible comprobar que el proceso de encapsular una solución del pigmento con Alginato de sodio favorece significativamente la estabilidad del pigmento ante factores como la luz y el aire, los parámetros cinéticos de degradación son comparables con los de la muestra acuosa almacenada a pH 3 en ausencia de luz y aire (condición más estable).

## RECOMENDACIONES

A partir del conocimiento originado en este trabajo de grado, quedan abiertas diferentes opciones de investigación: optimizar las condiciones de extracción para mejorar los rendimientos, evaluar nuevos sistemas para encapsular la muestra (maltodextrinas, ciclodextrinas etc).

Con respecto a las actividades biológicas del extracto, deben evaluarse otros ensayos *in-vitro*. También es posible explorar los efectos terapéuticos *in vivo*.

## BIBLIOGRAFÍA

- ANDERSON, O; Francis, G. Thechniques of pigment identification. En: Plant pigments and their manipulation. Davies K. Ed: Blackwell Publishing: London (2004); p. 293-341.
- BRIDLE, P.; Timberlake, C. F. Anthocyanins as natural food colours- selected aspects. En: Food Chem. Vol., 58 (1997); p. 103-109.
- BROUILLARD, R. The in vivo expression of anthocyanins color in plant. En: Phytochem. Vol., 11 (1983); p. 1311-1323.
- CABRITA, L.; Fossen, T.; Andersen, O.M. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. En: Food Chem. Vol., 68 (2000); p. 101-107.
- CASSASA, F; Sari, S. Aplicación de los sistemas CIELAB a los vinos tinto. Correlación con algunos parámetros tradicionales. En: Journal of Enology and Viniculture. Vol., 63 (2006); p. 5669-5684.
- CEDILLO, C; Cruz, M; Beltrán, M. Identificación de los Espectros de antocianinas del fruto del cerezo dulce (Prunas Avium) Variedad sweetheart, en diferentes condiciones de extracción. VII Congreso Nacional de Ciencia de Alimentos. Guanajuato Gto. (2004); p. 351-357.
- CERÓN, I; Higueta, J; Cardona, J. Design and analysis of antioxidant compounds from Andes Berry fruits (Rubus glaucus Benth) using an enhanced-fluidity liquid extraction process with CO<sub>2</sub> and ethanol. En: Journal of Supercritical Fluids. Vol., 62 (Feb, 2012); p. 96–101.
- CHARFUELÁN, Claudia. Análisis químico de los pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del Ivilan (Monima obtusifolia). Trabajo de grado Química, Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Exactas y Matemáticas. Departamento de Química, 2012; 112p.
- CISNEROS, L; Cevallos, B. Stability of Anthocyanins-bases aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. En: Food Chemistry. Vol., 86 (2004); p, 72-76.
- CLIFFORD, M. Anthocyanins and other polyphenols - nature, occurrence and dietary burden. En: J. Sci. Food Agric. Vol., 80 (2000); p. 1063-1072.
- CLIFFORD, M. Miscellaneous phenols in foods and beverages – nature, occurrence and dietary burden. En: J. Sci. Food Agric. Vol., 80 (2000); p. 1126-1137.
- CONTRERAS, C; Calderon, J; Guerra, H; Garcia, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia En: Food Research International. Vol., 44 (2011); p. 2047-2053.
- CRESPY, V; Morand, C. The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. En: J. Physiol. Vol., 284 (2003); p. 980-988.

CROTEAU, R; Kutchan, T; Lewis, L. "Natural Products (Secondary Metabolites)". En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Vol., 12 (2000); p. 122.

CROZIER, A; Clifford, M; Crozier, A. Secondary Metabolites form fruits and vegetables: measurements and bioavailability. En: *Biol. Res.* Vol., 33 (200) p. 78-89.

DaCOSTA, C; Horton, D; Margolis, S. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis. En: *Journal of Chromatography A*. Vol., 881 (2000); p. 403–410.

DAVIN, L; Lewis, N. Phenylpropanoid metabolism: Biosynthesis of monolignols, lignans and neolignans, lignins and suberins. En: *Phenolic Metabolism in Plants*, H. A. Stafford, R. K. Ibrahim. New York (1992); p. 325-375.

DAVIS, A; Lewis, J; Cai, Y. A polyphenolic pigment from black tea. En: *Phytochemistry*. Vol., 46 (1997); p. 1397-1402.

DAY, A; Williamson, G. Biomarker for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. En: *Br. J. Nutr.* Vol., 86 (2001); p. 105-110.

DEGENHARDT, H; Knapp, P; Winterhalter, L. Separation and purification of anthocyanins by highspeed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol., 48 (2000); p. 338–343.

DELGADO, F.; Jimenez, A.; Paredes, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit Rev Food Sci Nutr.*; 40(3): 173-289 (2000).

DEWICK, P. Medicinal natural products, cap 4: The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. En: *John Wiley*. Vol., 2 (2002); p. 121-164.

DIXON, R; Steele, C. Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. En: *Trends Plant Sci*. Vol., 4 (1999); p. 394-401.

DONNER, H; Gao, L; Mazza, G. Separation and characterization of simple and malonylated anthocyanins in red onions, *Allium cepa* L. En: *Food Research International*. Vol.,30 (1997); p. 637-643.

DRAGET, K. Alginates. En: *Handbook of hydrocolloids*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited -Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC. (2000); p. 379-395.

DREISEITEL, A; Korte, G; Schreier, P; Oehme, A; Locher, S; Domani, M; Hajak, G; Sand, P. Berry anthocyanins and their glycons inhibit monoamine oxidases A and B. En: *Pharmacological Research*. Vol., 59 (2009); p. 306-311.

DUAN, X; Jiang, Y; Su, X; Zhang, Z; Shi, J. Antioxidant properties of anthocyanins extracted from Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. En: *Food Chemistry*. Vol.,101, (2007); p.1365–1371.

- EIRO, M; Heinonen, M. Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol., 50 (2002); p. 7461–7466.
- ESCRIBANO, M; Santos, C; Julian, C; Rivas, G. Anthocyanins in cereals. En: Journal of chromatography. Vol., 1054 (2004) p. 129-141.
- FELGINES, C; Talavera, S; Gonthier, M. Strawberry Anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. En: J. Nutri. Vol., 133 (2003); p. 1296-1301.
- FERNANDEZ, I; Marques, F; Freitas, V; Mateus, N. Antioxidant and antiproliferative properties of methylated metabolites of anthocyanins. En: Food Chemistry. (May, 2013); <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.033>.
- FLESchUT, J; Kratzer, F; Rechkemmer, G; Kulling, S. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. En: European Journal of Nutrition. Vol., 45 (2006); p.. 7–18.
- FRANCIS, F. Concentrates as colorants. En: The world of ingredients. Vol., 3 (1995); p. 26-27.
- FRANCIS, F. Food colorants: Anthocyanins. Department of food science and nutrition. University of Massachusetts. Rev. En: Food Sci & Nutr. Vol., 28 (1989); p. 273-314.
- FROYTLOG, C; Slimestad, R. Combination of chromatographic techniques for the preparative isolation of Anthocyanins- applied on blackcurrant (*Ribesnigrum*) fruits. En: Journal of Chromatography. Vol., 825 (1998); p. 89-95.
- GALVANO, F; La Fauci, L; Lazzarino, G. Cyanidins: metabolism and biological properties. En: Journal Nutr Biochem. Vol., 15 (2004); p. 2-11.
- GARCIA, A; Rimbach, G; Rivas, G. Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins A - studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. En: J. Agric. Food Chem. Vol., 52 (2004); p. 3378–3384.
- GARCIA, E., Cabello, F., & Revilla, E. Analysis of grape and wine of Anthocyanins and catequin by HPLC–MS. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry Vol., 51 (2003); p. 5622–5629.
- GHISELLI, A; Nardini, M; Baldi, A; Scaccini, C. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol., 46 (1998); p. 361–367.
- GHISELLI, A; Nardini, M; Baldi, A; Scaccini, C. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol., 46 (1998); p. 361–367.
- GIUSTI, M.; Wrolstad, R. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. En: Biochem. Eng. J. Vol., 14 (2003); p. 217-225.
- GIUSTI, M; Rodriguez, L; Wrolstad R. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and nonacylated pelargonidin-based anthocyanins. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol., 47 (1999); p. 4631-4637.

- GUTIERREZ, M.; Camacho, F. Aprovechamiento de plantas medicinales. Instituto de Investigaciones forestales y agrícolas. Colombia (2002) pág. 4-6.
- HARBORNE, J; Williams, C. Anthocyanins and other flavonoids, natural products. En: Natural Product Reports. Vol., 15 (1998); p. 631–652.
- HASEGAWA, S; Lam, L; Miller, E. Flavonoids: biochemistry and possible importance in human nutrition. En: Phytochemical and Phytopharmaceuticals. Vol., 2 (2000); p. 95-105.
- HASHIMOTO, F; Nonaka, G; Nishioka, A. Tannins and related compounds LVI. Isolation of four new acylated flavan-3-ols from oolong tea. En: Chem. Pharm. Bull. Vol., 34 (1988); p. 61-65.
- HASSAN, H; Abdel, A. Evaluation of free radical-scavenging and anti-oxidant properties of black berry against fluoride toxicity in rats. En: Food and Chemical Toxicology. Vol., 48 (2010); p. 1999 - 2004.
- HEDIN, P; Jenkins, J; Collum, D; White, W; Parrott, W; MacGown, M. Cyanidin-3- $\beta$ -glucoside, a newly recognized basis for resistance in cotton to the tobacco budworm *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). En: Experientia. Vol., 39 (1983); p. 799-801.
- HELGT, H; Heldt, F. Plant Biochemistry. En: Elsevier Academic Press Amsterdam. Vol., 12 (2005); p. 12-18.
- HENKE, H. Preparative Gel Chromatography on Sephadex LH-20, Hüthig GmbH, Heidelberg (1995).
- HENRIQUEZ, C; Aliaga, C; Lissi, E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: A comparison of different preparation procedures. (2002); p. 659-660.
- HERRMANN, K. On the occurrence of flavonol and flavones glycosides in vegetables. En: Lebensm Unters, Forsch. Vol., 6 (1988); p. 1-5.
- HO, C; Lee, C; Huang, M. T. Phenolic compounds in food and their effects on health II. Antioxidants and cancer prevention. American Chemical Society, Washington, DC, (1992).
- HOFFMANN, C; Harborne, J; McCaffery, A. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts anthocyanins and rutin on *Trichoplusia ni* growth. En: Entomol. Exp. Vol., 98 (2001); p. 181-194.
- HOLTON, T; Cornish, E. Genetics and biochemistry of polyphenols biosynthesis. En: Plant Cell. Vol., 7 (1995); p. 1071-1083.
- HWANG, Y; Wu, K; Kumamoto, J; Axelrod, H; Mulla, M. Isolation and identification of mosquito repellents in *Artemisia vulgaris*. En: J. Chem. Ecol. Vol., 11 (1985); p. 1297-1306.
- HYOUNG, S; Lee, V. Chromatographic analysis of anthocyanins, En: Journal of Chromatography. Vol., 624 (1992); p. 221-234.

- IWAI, K; Onodera, A; Matsue, H. Identification and antiradical properties of anthocyanins in fruits of *Viburnum dilatatum* thunb. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol., 51 (2003); p. 6173–6177.
- JACKMAN, R; Yada, R; Tung, M; Speers, R. Anthocyanins as food colorants – a review. En: *Journal of Food Biochemistry*. Vol., 58 (1987); p. 201-247
- JANNA, O; Khairul, A. Anthocyanin stability studies in *tibouchina semidecandra*. En: *Journal of biochemistry and molecular biology*. Vol., 101 (2007); p. 1642-1649.
- JIMENEZ, Juan; Villareal, John. Estudio químico de pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del motilón (*Hyeronima macrocarpa*). Trabajo de grado Química, Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Exactas y Matemáticas. Departamento de Química, 2008; 103p.
- KAHKONEN, M; Hopia, A; Heinonen, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol., 49 (2001); p. 4076–4082.
- KAMEI, H; Kojima, T; Hasegawa, M; Koide, T; Umeda, T; Yukawa, T. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. En: *Cancer Investigation*. Vol., 13 (1995); p. 590–594.
- KAPADIA, G; Tokuda, H; Sridhar, R. Cancer chemopreventive activity of synthetic colorants used in foods, pharmaceuticals and cosmetic preparations. En: *Cancer Letters*. Vol., 129 (1998), p. 87-95.
- KAUFMAN, M; Cseke, L. *Natural Products from plants*. Crc Press. United States of America. (1998); p. 65-67.
- KING, A. Brown Seaweed Extracts (Alginates). En: *Food Hydrocolloids*. Vol., 3 (1983); p. 115.
- KOŁODZIEJCZYK, J; Saluk-Juszczak, J; Posmyk, M; Janas K.M., Wachowicz B. Red cabbage anthocyanins may protect blood plasma proteins and lipids. En: *Journal of Biology*. Vol., 6 (2011); p. 565-574.
- KONGA, J; Chia L.; Goha, N. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Journal of Phytochemistry* 64, 923–933 (2003).
- KUSKOSKI, E; Vega, J; Rios, J; Fett, R; Troncoso, A; Asuero, A. Characterization of anthocyanins from the fruits of *baguacu* (*Eugenia umbelliflora* Berg). En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol., 51 (2003); p. 5450–5454.
- KUSKOSKI, M; Asuero, A. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. En: *Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas*. Vol., 25 (2005); p. 726-732.
- LAZZE, M.; Pizzala, R.; Savio, M.; Stivala, L.A.; Prosperi, E.; Bianchi, L. Anthocyanins protection against DNA damage induced by *ter-butyl-hydroperoxide* in rat smooth muscle and hepatoma cells. En: *Mutat. Res*. Vol., 535 (2003); p. 103-115.
- LI, H; Deng, Z; Zhu, H; Hu, C; Liu, R; Young, J; Tsao, R. Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. En: *Food Research International*. Vol., 46 (2012); p. 250-259.

- LIN, J; Liang, Y. Survey of catechins, gallic acid and methylxanthines in green, oolong, pu'erh and black teas. En: J. Agric. Food Chem. Vol., 46 (1998); p. 3635-3642.
- LINCOLN, T; Zeiger, E. "Secondary Metabolites and Plant Defense". En: Plant Physiology, Vol., 2 (2006); p. 215.
- LONGO, L; Vasapollo, G. Anthocyanins from bay (*Laurus nobilis* L.) berries. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol., 53 (2005); p.. 8063–8067.
- MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in food. En: Anthocyanins as food colors. P. Markakis (Ed.); Academic Press, New York, (1992); p. 163-181.
- MARTIN, A; Ferreres, F; Tomas-Barberán, F. Characterization and quantification of antioxidants constituents of sweet pepper (*Capsicum annum* L.). En: J. Agric. Food Chem. Vol., 52 (2004); p. 861-3869.
- MARTINEZ, J; Gonzales, J. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. En: Nutr. Hosp. Vol., XVII (2002); p. 271 – 278.
- MATEUS, N; Silva, A; Santos, C. Identification of Anthocyanins – flavanol pigments in red wines by NMR and mass spectrometry. En: J. Agric. Food Chem. Vol., 50 (2002); p. 2110-2116.
- MATSUFUJI, 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.
- MIURA, K; Kikuzaki, H. Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) measured by the oil stability index method. En: J. Agric. Food Chem. Vol., 50 (2002); p. 1845-1851.
- MORIMITSU, Y.; Kubota, K.; Tashiro, T.; Hashizume, E.; Kamiyo, T.; Osawa, T. Inhibitory effect of anthocyanins and colored rice on diabetic cataract formation in the rat lenses. ICS. 1245 (2002); p. 503-508.
- NODA, Y.; Kaneyuki, T.; Mori, A.; Packer, L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyaniding, and pelargonidin. En: J. Agric. Food Chem. Vol., 50 (2002); p. 166-171.
- ORDAZ, A; Wesche-Ebeling, P; Wrolstad, L; Rodriguez, L; Argai, A. Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina* Ehrh.) anthocyanins. En: Journal Food Chemistry. Vol., 65 (1999) p. 201-206.
- OSORIO, C; Hurtado, N; Dawid, C; Hofmann, T; Heredia, F; Morales, A. Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits En: Food Chemical. Vol., 132, (Jun, 2012); p. 1915-1921.
- PAGANGA, G; Miller, N; Rice, C. The phenolic content of fruits and vegetables and their antioxidant activities. En: FEBS Lett. Vol., 401 (1999) p. 78-82.

PASCUAL,T; Sanchez, M. Anthocyanins: From plant to health Reviews. En: Food Phytochemistry. Vol., 7 (2008); p. 281-299.

PETRIDIS, G. Tannins: types, foods containing, and nutrition. Hauppauge, N.Y.: Nova Science Publishers; Available from: eBook Academic Collection (EBSCOhost), Ipswich, MA. (2011).

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

RE, R; Pellegrini, N; Proteggente, A; Pannala, A. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. En: J. Free Radical Biology and Medicine. Vol., 26 (1999); p. 1231-1237.

REBOLO, S. Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos. Tesis doctorado en ciencias químicas, España: Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de ciencias. Departamento de química analítica, nutrición y bromatolog a (2007) p. 201.

REIN, M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins, University of Helsinki, Department of applied chemistry and microbiology food chemistry division, Finlandia (2005); p. 423.

REVILLA, E; Ryan, J. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol., 46 (1998); p. 4592–4597.

RODRIGUEZ, L.; Giusti, M.; Wrolstad, R. Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems. En: Journal of Food Science. Vol., 64 (1999); p. 451–456.

SAINT-CRICQ, N.; Glories, Y.; Vivas, N. Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. En: Food Res. Int. Vol., 32 (1999); p. 327-333.

SANTOS, D; Albarelli, J; Beppu, M; Meireles, M. Stabilization of anthocyanin extract from jabuticaba skins by encapsulation using supercritical CO<sub>2</sub> as solvent. En: Food Research International. Vol., 50 (2011); p. 617-624.

SHAHIDI, F; Han, X. Encapsulation of food ingredients. Critical Reviews. En: Food Science and Nutrition. Vol., 33 (1993); p. 501-547.

SHIRLEY, B. Flavonoide biosynthesis: New functions for an old pathway. En: Trends Plant Sci. Vol., 1 (1996); p. 377-382.

TORSKANGERPOLL, K; Chou, E; Andersen, M. Separation of acylated anthocyanin pigments by high speed CCC. En: Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies. Vol., 24 (2001); p. 1791–1799.

TSADA, T.; Hono, F.; Kitoh, J.; Osawa, T. Protective effects of dietary cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside on liver ischemia-reperfusion injury in rats. En: Archi. Biochem. Biophys. Vol., 368 (1999); p. 361-366.

TSUDA, T; Watanabe, M; Ohshima, K; Norinobu, S; Choi, S. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyaniding 3-O-beta-d-glucoside and cyanidin. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry Vol., 42 (1994); p. 2407–2410.

TURKER, N; Erdogdu, F. Effects of pH and temperature of extraction medium of effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot. En: Journal of Food Engineering. Vol., 76 (2006); p. 579-583.

VALLEJO, F; Barberán, A. Characterization of flavonols in broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry. En: J. Chromatogr. A. Vol., 1054 (2004); p. 181-193.

VELIOGLU, Y; Mazza, G; Gao, L; Oomah, B. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol., 46 (1998); p. 4113–4117.

WANG, M; Simon, J. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus*). En: J. Agric. Food Chem. Vol., 51 (2003); p. 601-608.

WATKINS, T. Wine: Nutritional and Therapeutic Benefits. ACS Symposium Series 661. En: American Chemical Society, Washington, DC, USA. (1997); p. 321.

WROLSTAD, R; Durst, R; Lee, J. Tracking color and pigment changes in Anthocyanins products. En: Food Science and Technology. Vol., 16 (2005) p. 423-428.

WU, X; Prior, R. Systematic identification and characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. En: J. Agric. Food Chem, Vol., 53 (2005); p. 2589-2599.

XIONG, S; Melton, L; Easteal, A; Siew, D. Stability and antioxidant activity of black currant anthocyanins in solution and encapsulated in glucan gel. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol., 54 (2006); p. 6201-6208.

YOSHIDA, T; Nakazawa, T. Tannins from theaceous plants: A dimeric hydrolysable tannins from *Camellia oleifera*. En: Phytochemistry. Vol., 37 (1994); p. 241-244.

ZEIGER, E. Secondary Metabolites and Plant Defense. En: Biochemistry of the Plant. Vol., 4 (2006); p. 321-324.

Este trabajo hace parte del proyecto Análisis Químico y Evaluación de las propiedades antioxidantes In-Vitro de extractos de polifenoles y antocianinas del fruto de Capulí (*Prunus serotina* Ehrh), aprobado por la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales (VIPRI) mediante el acuerdo 119 de septiembre 26 de 2011.