

EVALUACIÓN DE TRES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS POLIFENOLES  
(ANTOCIANINAS) DEL FRUTO DE *Eugenia malaccensis* E IDENTIFICACIÓN QUÍMICA  
DE LOS CONSTITUYENTES MAYORITARIOS.

VANESSA JURADO DÁVILA

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

2014

EVALUACIÓN DE TRES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS POLIFENOLES  
(ANTOCIANINAS) DEL FRUTO DE *Eugenia malaccensis* E IDENTIFICACIÓN QUÍMICA  
DE LOS CONSTITUYENTES MAYORITARIOS.

VANESSA JURADO DÁVILA

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de químico

Director

Nelson Humberto Hurtado G.

Ph,D Ciencias Químicas

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

2014

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

Artículo 1º del acuerdo No. 324 del 11 de octubre de 1966, emanado del honorable consejo directivo de la universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

Nelson Humberto Hurtado Gutierrez

Director

Juan José Lozada castro

Jurado

Olga Lucia Benavides

Jurado

San Juan de Pasto, marzo de 2014.

## RESUMEN

La familia MYRTACEAE es una planta de origen amazónico que se caracteriza por la existencia de diversas especies. Dentro de la familia de MYRTACEAE, se encuentra el pomoroso (*Eugenia malaccensis*), su fruto en su estado de maduración presenta una cascara de intenso color rojo que podría ser una fuente importante de pigmentos naturales. En este sentido, en este trabajo de investigación se evaluaron diferentes procesos de extracción de este tipo de compuestos y se identificaron los constituyentes mayoritarios. La cáscara del fruto fue sometida a tres técnicas de extracción diferentes: extracción con solventes, extracción asistida con microondas y extracción por fermentación alcohólica. Para valorar el mejor método de extracción se tomó como variable de respuesta el contenido de fenoles totales (método de Folin Ciocalteu) y el contenido de antocianinas monoméricas (método de pH diferencial). Con respecto al contenido fenólico los resultados mostraron que el mejor método de extracción es la extracción con solventes (332,6 mg de ácido gálico/100 g de fruta). Sin embargo, el estudio del contenido de antocianinas monoméricas de los extractos crudos aislados mediante los diferentes métodos de extracción mostró que el mejor método que aísla este tipo de compuestos es la fermentación alcohólica (79,8 mg cy-3-glu/100g de fruto).

Posteriormente, y con el firme propósito de contribuir al conocimiento de la composición química de los pigmentos, el extracto crudo aislado a partir de la fermentación alcohólica de la muestra se sometió a purificación por cromatografía de columna y a cromatografía de exclusión por tamaño con el fin de separar las antocianinas poliméricas y monoméricas.

El extracto purificado y las fracciones de antocianinas monoméricas se analizaron por HPLC de tipo analítico. Se encontró un pico mayoritario y el cromatograma del extracto puro mostró señales con tiempos de retención similares a los cromatogramas obtenidos para las fracciones de antocianinas monoméricas.

Mediante HPLC-MS se encontró tres compuestos mayoritarios presentes en el extracto que se identificaron como: cianidina-3-cumaroilglucosa, cianidina-3-galactósido y cianidina-3-glucósido.

## ABSTRACT

The family MYRTACEAE is a plant Amazonian origin that is characterized by the existence of various species. Within the family of MYRTACEAE, is the pomoroso (*Eugenia malaccensis*), its fruit in its state of maturity has a deep red shell could be an important source of natural pigments. In this sense, this research evaluated different extraction processes such compounds and identified the major constituents. The fruit peel was subjected to three different extraction techniques: solvent extraction, microwave assisted extraction and fermentation extraction. To assess the best method of extraction was taken as the response variable total phenolic content (Folin Ciocalteu) and monomeric anthocyanin content (pH differential method). Phenolic content regarding the results showed that the best method of extraction is the extraction with solvents (332.6 mg galic/100 g fruit acid). However, the study of monomeric anthocyanin content of the crude extracts isolated by different extraction methods showed that the best method asila these compounds is the alcoholic fermentation (79.8 mg fruit cy-3-glu/100g).

Subsequently, with the firm purpose of contributing to knowledge of the chemical composition of the pigments, the crude extract isolated from the fermentation of the sample was subjected to purification by column chromatography and size exclusion chromatography in order to separating polymeric and monomeric anthocyanins.

The purified extract fractions monomeric anthocyanins were analyzed by an analytical HPLC. There was a major peak which corresponded which was identified as cyanidin -3 -glucoside. The chromatogram showed signs pure extract with retention times similar to the chromatograms obtained for the fractions of monomeric anthocyanins.

HPLC -MS was found three major compounds present in the extract were identified as: cyanidin -3- cumaroilglucosa, cyanidin -3- galactoside and cyanidin -3-glucoside.

## 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
2.3 MARCO CONTEXTUAL	22
2.3 MARCO TEÓRICO	23
2.3.1 POLIFENOLES y PROPIEDADES	23
2.3.2 ESTRUCTURA, CLASIFICACIÓN y PROPIEDADES DE LOS FLAVONOIDES	24
2.3.3 ANTOCIANINAS	27
2.3.4 MÉTODOS EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS	28
2.3.5 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS	30
2.3.6 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE ANTOCIANINAS	32
2.3.7 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES	34
2.3.8 DISEÑO EXPERIMENTAL ALEATOREAMENTE COMPARATIVO	35
2.3.8.1 MEDIDAS DE CENTRALIDAD	36
2.3.8.1.1 Media aritmética	36
2.3.8.2 MEDIDAS DE DISPERSIÓN	36
2.3.8.2.1 Desviación típica	36
2.3.8.2.2 Coeficiente de variación	37





2.3.8.4 DISPERSIÓN DE LOS DATOS	37
2.3.8.4.1 Datos no agrupados	37
2.3.8.4.2 Grados de libertad (GL)	38
2.3.8.5 DISTRIBUCIONES	38
2.3.8.5.1 Ensayo t	38
2.3.8.5.1 Chi-cuadrado	38
2.3.8.5.2 Prueba de Shapiro-Wilk	38
2.3.8.6 INTERVALOS DE CONFIANZA	38
2.3.8.7 ANÁLISIS DE REGRESIÓN	39
2.3.8.7.1 MÉTODOS DE MÍNIMOS CUADRADOS	39
2.3.8.7.1.1 Regresión lineal simple	39
2.3.8.7.1.2 Estadístico R-Cuadrado	39
2.3.8.7.1.3 Estadístico de Durbin-Watson (DW)	39
2.3.8.8 PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA	40
3.METODOLOGÍA	41
3.1 Recolección del material vegetal	41
3.2 Obtención del extracto crudo de la cáscara del fruto	41
3.3 Extracción convencional con solventes	41
3.4 Extracción asistida con microondas	42
3.5 Extracción mediante fermentación alcohólica	42
3.6 Determinación de fenoles totales	42
3.7 Cuantificación de antocianinas monoméricas	43
3.8 Cuantificación de antocianinas poliméricas	43
3.9 Determinación del método de extracción más eficiente	43
3.10 Purificación del extracto crudo	43
3.10.1 Separación de compuestos lipofílicos y medianamente polares	43
3.10.2 Obtención del extracto rico en antocianinas	44
3.10.3 Separación de antocianinas monoméricas y poliméricas	44
3.11 Identificación química de los componentes mayoritarios	44
3.11.1 Análisis por HPLC	44
3.11.2 Análisis por HPLC-SM	45
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
4.1 OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL	46
4.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	46
4.3 EVALUACIÓN DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA UV-	48

Vis

4.3.1 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES	48
4.3.1.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS MEDIANTE LOS DIFERENTES PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCION PARA EL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES	51
4.3.1.1.1 Identificación de Valores Atípicos – Contenido de Fenoles totales	51
4.3.1.1.2 Prueba de Grubb para el contenido de fenoles totales	51
4.3.1.1.3 Prueba de Dixon para el contenido de fenoles totales	52
4.3.1.1.4 Pruebas de Normalidad para el contenido de fenoles totales	52
4.3.1.1.5 ANOVA Simple – Contenido de fenoles totales por método de extracción	53
4.3.1.1.6 Verificación de Varianza para el contenido de fenoles totales	53
4.3.1.1.7 Modelos Lineales Generalizados para el contenido de fenoles totales	54
4.3.2 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS	57
4.3.2.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS MEDIANTE LOS DIFERENTES PROCEDIMIENTOS DEL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS	59
4.3.2.1.1 Identificación de Valores Atípicos – Antocianinas monoméricas	60
4.3.2.1.2 Prueba de Grubbs para el contenido de antocianinas monoméricas	60
4.3.2.1.3 Prueba de Dixon para el contenido de antocianinas monoméricas	60
4.3.2.1.4 Pruebas de Normalidad para el contenido de antocianinas monoméricas	61
4.3.2.1.5 ANOVA Simple - Contenido de Antocianinas Monoméricas por Método de extracción	61
4.3.2.1.6 Verificación de Varianza para el contenido de antocianinas monoméricas	62
4.3.2.1.7 Modelos Lineales Generalizados para antocianinas monoméricas	63
4.3.3 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS POLIMÉRICAS	66
4.3.3.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS MEDIANTE LOS DIFERENTES PROCEDIMIENTOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS POLIMÉRICAS	70
4.3.3.1.1 Identificación de Valores Atípicos – Color polimérico	70
4.3.3.1.2 Prueba de Grubbs para el color polimérico	70
4.3.3.1.3 Prueba de Dixon para el color polimérico	70
4.3.3.1.4 Pruebas de Normalidad para el color polimérico	71
4.3.3.1.5 ANOVA Simple - Color polimérico por método de extracción	71
4.3.3.1.6 Verificación de Varianza para el color polimérico	72
4.3.3.1.7 Modelos Lineales Generalizados para el color polimérico	73
4.4 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO	76

4.5 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS	76
4.5.1 Análisis por HPLC	76
4.5.2 ANÁLISIS POR HPLC-SM	81
CONCLUSIONES	86
RECOMENDACIONES	87
BIBLIOGRAFÍA	88

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Intervalos de confianza.	39
TABLA 2. Análisis de varianza.	40
TABLA 3. Equipos y reactivos	41
TABLA 4. Gradiente HPLC analítica.	44
TABLA 5. Gradiente HPLC-SM.	45
TABLA 6. Pesos de extracto de la crudo de pomorroso.	47
TABLA 7. Datos de Absorbancia para patrones de ácido gálico.	48
TABLA 8. Contenido de fenoles totales para ES.	49
TABLA 9. Contenido de fenoles totales para EAM.	50
TABLA 10. Contenido de fenoles totales para EFA.	50
TABLA 11. Estadísticos de centralidad y dispersión para el contenido de fenoles totales.	51
TABLA 12. Identificación de valores atípicos para el contenido de fenoles totales con la prueba de Dixon.	52
TABLA 13. Pruebas de normalidad para el contenido de fenoles totales.	52
TABLA 14. ANOVA para el contenido de fenoles totales por método de extracción	53
TABLA 15. Prueba de Levene para verificación de varianza del contenido de fenoles totales	53
TABLA 16. Suma de Cuadrados para el contenido de fenoles totales	54
TABLA 17. Medias de Mínimos Cuadrados para el contenido de fenoles totales con intervalos de confianza del 95,0 %	55

TABLA 18. Comparaciones Múltiples para el contenido de fenoles totales por método de extracción	56
TABLA 19. Diferencias significativas entre los métodos de extracción para el contenido de fenoles totales	56
TABLA 20. Datos a pH1 para ES	58
TABLA 21. Datos a pH 4.5 para ES	58
TABLA 22. Datos a pH1 para EAM	58
TABLA 23. Datos a pH 4.5 para EAM	58
TABLA 24. Datos a pH1 para EFA	58
TABLA 25. Datos a pH 4.5 para EFA	59
TABLA 26. Contenido de antocianinas monoméricas en ES, EAM y EFA.	59
TABLA 27. Estadísticos de centralidad y dispersión para el contenido de antocianinas monoméricas.	59
TABLA 28. Identificación de valores atípicos para el contenido de antocianinas monoméricas con la prueba de Dixon	60
TABLA 29. Pruebas de normalidad para el contenido de antocianinas monoméricas	60
TABLA 30. ANOVA para el contenido de antocianinas monoméricas por método de extracción	61
TABLA 31. Prueba de Levene para verificación de varianza del contenido de antocianinas monoméricas	62
TABLA 32. Suma de Cuadrados para el contenido de antocianinas monoméricas	62
TABLA 33. Medias de Mínimos Cuadrados para el contenido de Antocianinas Monoméricas con intervalos de confianza del 95,0 %	63
TABLA 34. Comparaciones Múltiples para el contenido de antocianinas monoméricas por método de extracción	64
TABLA 35. Diferencias significativas entre los métodos de extracción para el contenido de antocianinas monoméricas	62

TABLA 36. Datos tomados en agua para ES	65
TABLA 37. Datos tomados en metabisulfito de sodio para ES	65
TABLA 38. Datos tomados en agua para ES a 420 nm	66
TABLA 39. Datos tomados en metabisulfito de sodio para ES a 420 nm	66
TABLA 40. Datos tomados en agua para EAM	67
TABLA 41. Datos tomados en metabisulfito de sodio para EAM	67
TABLA 42. Datos tomados en agua para EAM a 420 nm	67
TABLA 43. Datos tomados en metabisulfito de sodio para EAM a 420 nm	68
TABLA 44. Datos tomados en agua para EFA	68
TABLA 45. Datos tomados en metabisulfito de sodio para EFA	68
TABLA 46. Datos tomados en agua para EFA a 420 nm	68
TABLA 47. Datos tomados en metabisulfito de sodio para EFA a 420 nm	68
TABLA 48. Datos para la densidad de color para ES, EAM y EFA	69
TABLA 49. Datos para el color polimérico para ES, EAM y EFA	69
TABLA 50. Datos para el porcentaje color polimérico para ES, EAM y EFA	69
TABLA 51. Estadísticos de centralidad y dispersión para el color polimérico.	69
TABLA 52. Identificación de valores atípicos para el color polimérico con la prueba de Dixon.	70
TABLA 53. Pruebas de normalidad para el color polimérico	70
TABLA 54. ANOVA para el color polimérico por método de extracción	71
TABLA 55. Prueba de Levene para verificación de varianza para el color polimérico	72
TABLA 56. Suma de Cuadrados para el color polimérico	72
TABLA 57. Medias de Mínimos Cuadrados para el color polimérico con intervalos	73

de confianza del 95,0 %

TABLA 58. Comparaciones Múltiples para el color polimérico por método de extracción	74
TABLA 59. Diferencias significativas entre los métodos de extracción para el color polimérico	75
TABLA 60. Pesos para las tres muestras de ERA para EFA.	76
TABLA 61. Tiempos de retención compuestos para ERA	77
TABLA 62. Tiempos de retención y posibles compuestos para la fracción 1 de antocianinas monoméricas	79
TABLA 63. Tiempos de retención para la fracción 2 de antocianinas monoméricas	80
TABLA 64. Comparación de las señales obtenidas por las fracciones de antocianinas monoméricas con el extracto puro.	80

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Fruto de pomorroso	22
FIGURA 2. Flavonoides. Estructura básica y tipos	25
FIGURA 3. Estructuras de algunos flavonoides	26
FIGURA 4. Estabilidad frente al pH de las antocianinas	29
FIGURA 5. Estructura del diseño experimental.	35
FIGURA 6. Estructura del posible compuesto correspondiente a la señal a.	82
FIGURA 7. Estructura del posible compuesto correspondiente a la señal b.	83
FIGURA 8. Estructura del posible compuesto correspondiente a la señal c.	84



## LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
GRÁFICA 1. Espectro UV-Vis del extracto de antocianinas del pomorroso (ES).	46
GRÁFICA 2. Espectro UV-Vis del extracto de antocianinas del pomorroso (EAM).	46
GRÁFICA 3. Espectro UV-Vis del extracto de antocianinas del pomorroso (EFA).	47
GRÁFICA 4. Promedio del peso de extracto crudo para cada método de extracción	48
GRÁFICA 5. Curva de calibración para determinar el contenido de fenoles totales	49
GRÁFICA 6. Caja y Bigotes para el contenido de fenoles totales.	52
GRÁFICA 7. Caja y Bigotes para el contenido de fenoles totales por cada método de extracción.	54
GRÁFICA 8. Contenido de fenoles totales en diferentes frutos.	57
GRÁFICA 9. Caja y Bigotes para el contenido de antocianinas monoméricas.	61
GRÁFICA 10. Caja y Bigotes para el contenido de antocianinas monoméricas por cada método de extracción.	63
GRÁFICA 11. Contenido de antocianinas monoméricas en diferentes frutos	66
GRÁFICA 12. Caja y Bigotes para el color polimérico	71
GRÁFICA 13. Caja y Bigotes para el color polimérico por método de extracción	72

GRÁFICA 14. Cromatograma para ERA	77
GRÁFICA 15. Perfil UV-vis para la señal 4 de ERA.	78
GRÁFICA 16. Cromatograma para la fracción 1 de antocianinas monoméricas	78
GRÁFICA 17. Cromatograma para la fracción 2 de antocianinas monoméricas.	79
GRÁFICA 18. Cromatograma obtenido por HPLC-SM para ERA	81
GRÁFICA 19. Espectro de masas para la señal a	81
GRÁFICA 20. Espectro de masas para la señal b	82
GRÁFICA 21. Espectro de masas para la señal c.	83

## GLOSARIO

ES: Extracción con solventes.

EAM: Extracción asistida con microondas.

EFA: Extracción por fermentación alcohólica.

UV-Vis: Ultravioleta visible.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia.

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

$\lambda$  Amax-vis: Absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción en la región visible.

$\lambda$  A440: Absorbancia a 440 nm.

CC: cromatografía de columna.

Cy-3-glu: cianidina-3-glucosido.

ESI-SM: Espectrometría de masas por ionización electrospray.

FD: Factor de dilución.

HPLC-DAD: Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos.

MS: Espectrometría de masas.

Tr: Tiempo de retención.

EC: Extracto crudo

ERA: Extracto rico en antocianinas

## INTRODUCCIÓN

Las plantas continúan siendo una de las principales fuentes de extractos y compuestos con actividad farmacológica como es el caso de los polifenoles, dentro los cuales están los pigmentos tipo antocianina de gran interés en la aplicación como colorantes para alimentos<sup>1</sup> en remplazo de los colorantes sintéticos, debido a que investigaciones han demostrado que los aditivos sintéticos tienen efectos tóxicos para la salud humana<sup>2</sup>. El gran interés de los colorantes naturales y el desconocimiento de la composición química de la flora es una situación que motiva este tipo de investigaciones. Por lo tanto, la búsqueda de eficientes métodos de extracción como estrategia para valorar cuantitativamente el contenido y composición de este tipo de compuestos (polifenoles) en especies de la región, ya que investigaciones recientes como Gongjian F. et al (2008), concluyen que el consumo de polifenoles en la dieta tiene efectos positivos sobre la salud humana. En este contexto, la biodiversidad colombiana tiene un gran potencial para el aprovechamiento de los recursos vegetales que aportan color, para lo cual es de suma importancia evaluar no solo un método de extracción eficiente, si no también caracterizar apropiadamente su composición química. Aunque existen múltiples estudios sobre esta clase de metabolitos, es necesario investigar nuevas especies que los contengan con el fin de valorar su contenido y eventualmente identificar nuevas moléculas que posean no solo una mayor estabilidad sino también que tengan un eventual beneficio para la salud humana.

El fruto de *Eugenia malaccensis*, pertenece a la familia de Myrtaceae cuyo árbol crece principalmente en la región amazónica del departamento del Putumayo, en la costa pacífica, entre otros. Este tipo de árbol posee frutos con pulpa blanca y cáscara de coloración rojo intenso, lo cual generó el interés en el estudio de los compuestos responsables del color, y así evaluar un método eficiente para la obtención de los compuestos de interés (antocianinas). Desde esta perspectiva, en esta propuesta de investigación se planteó realizar la comparación de tres métodos de extracción, uno de ellos fué la extracción con solventes, una técnica muy utilizada para obtener este tipo de compuestos de fuentes vegetales, otra es la extracción mediante la fermentación alcohólica con levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) que es un técnica eficiente, donde se obtiene pigmentos con mayor pureza que la técnica tradicional<sup>1</sup>, y la tercera técnica fue una extracción asistida con microondas, que se ha encontrado que es altamente eficiente y rápida en la extracción de antocianinas<sup>3</sup>, sin embargo, al igual que la extracción por fermentación alcohólica no se encuentra mucha información científica para estos métodos, debido a que la mayoría de las investigaciones se centran en la extracción tradicional, a pesar de las ventajas anteriormente mencionadas. Con la evaluación de las tres técnicas se realizó un análisis comparativo en cuanto a su eficiencia para obtener los polifenoles de interés industrial (antocianinas) y posteriormente se caracterizó el extracto por espectroscopía UV-Vis, HPLC y HPLC-SM.

---

<sup>1</sup> FAN, G; HAN, Y; GU, Z and GU, F. Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato cultur. En: LWT journal. Vol. 41 (sep. 2007); p. 1416.

<sup>2</sup> CHOU, P; MATSUI, S; MISAKI, K and MATSUDA, T. Isolation and identification of xenobiotic aryl hydrocarbon receptor ligands in dyeing wastewater. En: Environmental Science and Technology. Vol. 41, N° 2. (oct. 2007); p. 657.

<sup>3</sup> YANG, Z and ZHAI, W. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. En: *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Vol. 11. (mar. 2010); p. 476.

El aporte científico de la presente investigación fue la aplicación de diferentes técnicas de extracción para evaluar su eficiencia en cuanto a la cuantificación de polifenoles. Además de ello, se identificó químicamente los constituyentes mayoritarios presentes en el extracto rico en antocianinas del fruto de *Eugenia malaccensis*.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar tres procesos de extracción de los polifenoles (antocianinas) del fruto de *Eugenia malaccensis* e identificar químicamente sus constituyentes mayoritarios.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Implementar tres métodos de extracción (extracción convencional con solventes, extracción con microondas y extracción mediante fermentación con levaduras) de los polifenoles (antocianinas) del fruto de *Eugenia malaccensis* y valorar su eficiencia mediante la cuantificación de estos componentes por espectroscopia UV-Vis.
- Purificar, fraccionar, e identificar los compuestos polifenólicos del extracto crudo por cromatografía en columna, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía líquida de alta eficiencia.

## 2. MARCO REFERENCIAL

2.1 ANTECEDENTES: El árbol de pomarrosa crece generalmente en climas calientes, cuyos frutos se caracterizan por tener una pigmentación roja fuerte de la cual no se conoce estudios publicados relacionados con los métodos de extracción y el tipo de polifenoles (antocianinas) que constituyen su pigmentación, sin embargo, se encontraron referencias científicas de otras especies pertenecientes a la familia MYRTACEAE. Ésta familia de plantas crecen generalmente en climas trópicos, con concentraciones altas en América del Sur, Asia y Australia<sup>4</sup>. Un estudio relacionado se hizo en la universidad estatal paulista, en el campus Araraquara por Minucci et al (2008), donde se realizó estudio de la jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*), perteneciente a la familia de MYRTACEAE. La extracción se realizó con etanol y el análisis de las fracciones extraídas se hizo por distintas técnicas entre ellas cromatografías, EM, entre otros. Por medio de cromatografía de columna, evidenciaron la presencia de subfracciones de antocianinas, así como una significativa actividad antioxidante frente a enfermedades como la malaria. Sin embargo, los pigmentos no fueron completamente aislados, pero si se evidenció la presencia de antocianinas y otros polifenoles en las especies *Myrciaria cauliflora*<sup>4</sup>. Estudios similares se realizaron en la especie de *Eugenia brasiliensis* por Gema F, et al (2012), donde se analizó el extracto de polifenoles de los frutos, con fines terapéuticos. En esta investigación se identificaron nueve clases de antocianinas cuyo extracto fue obtenido mediante la técnica de extracción con solventes, además fueron analizados, con técnicas como la cromatografía líquida de Alta Resolución, con detector con arreglo de fotodiodos (HPLC-PDA) y cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Las antocianinas identificadas corresponden a Delfinina-3-glucosido, cianidina-3-galactosido, cianidina-3-glucosido, cianidina-3-arabinosida, delfinina-3-pentosida, cianidina-3-xilosida, malvidina-3-glucosida, delfinina y cianidina<sup>5</sup>.

De igual manera, investigaciones realizadas por Kurt et al (2007) frente al análisis cuantitativo de los componentes fenólicos y capacidad antiradical, fueron elaborados en catorce frutos comestibles pertenecientes a la familia de MYRTACEAE. Estas especies fueron cultivadas en zonas tropicales y los pigmentos fueron extraídos con solventes. Entre las especies estudiadas están: *Eugenia aggregata*, *E. brasiliensis*, *E. luschnathiana*, *E. reinwardtiana*, *Myrciaria cauliflora*, *M. dubia*, *M. vexator*, *cumini*, *S. curranii*, *S. jambos*, *S. javanicum*, *S. malaccense*, *S. samarangense*, y *S. samarangense var.* Se encontró que los compuestos antocianos fueron los más abundantes, entre ellos se encontraron cianidina-3-glucosido y delfinidina-3-glucosido.<sup>6</sup>

<sup>4</sup> MINUCCI, C; SIQUEIRA, H and DAMETTO, A. Estudo fitoquímico e das atividades antioxidante e antimalárica de myrciaria cauliflora berg. (MYRTACEAE). En: FAPESP. (2008); p. 1837.

<sup>5</sup> GEMA, F; KEYVAN, D; STURLAINNY, P ; KATHLEEN, W; ABDOULAYE, J. D; KURT, A; ROBERT, F; JEANINE, M; EDWARD, J. Anthocyanins from *Eugenia brasiliensis* edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment. En: Food Chemistry. (2012); p7.

<sup>6</sup> KURT A; HUI YANG; BEI JIANG; MARGARET J. BASILE; EDWARD J. K. Analytical Methods Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. En: Food Chemistry. Vol 109. (2012); p 890.



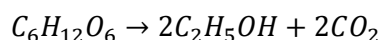
E. Marta Kuskoski et al (2003) estudiaron las antocianinas presentes en el extracto de *Eugenia umbelliflora* Berg, una fruta tropical de Brasil de la familia MYRTACEAE. La extracción se llevó a cabo con HCl 0,1% en etanol. Se purificó y se identificó seis antocianinas por medio de TLC, UV-Vis, espectrometría de masas y RMN. Las antocianinas identificadas corresponden a delfinidina 3-O-β-glucopiranosido, cianidina 3-O-β-glucopiranosido, petunidina 3-O-β-glucopiranosido, pelargonidina-3-O-β-glucopiranosido, peonidina 3-O-β-glucopiranosido y malvidina-3-O-β-glucopiranosido<sup>7</sup>.

Luigia Longo et al (2007) estudiaron el fruto de la especie *Eugenia myrtifolia* de la familia MYRTACEAE, donde obtuvieron el extracto mediante la utilización de la metodología convencional con solventes y caracterizaron el contenido de antocianinas encontrando únicamente la presencia de malvidina 3,5-O-diglicósido<sup>8</sup>.

Como se evidencia en los trabajos mencionados, los frutos estudiados de la familia MYRTACEAE, los polifenoles responsables de la coloración fueron las antocianinas, sin embargo todas las investigaciones se basan en el uso de solventes como técnica de extracción. Así mismo, en estudios previos, se evidenció el enfoque del uso de las antocianinas para fines farmacéuticos, cuyo análisis requiere su separación y purificación. Por consiguiente en el presente estudio, se pretende realizar la extracción de polifenoles a través de fermentación con levaduras, basándose en estudios previos como la extracción de antocianinas de color púrpura que fue investigada por científicos japoneses por medio de fermentación con el fin de encontrar un método mejor a la extracción con solventes.

Gongjian Fan et al (2010), investigaron la extracción de antocianinas a partir de la patata púrpura con *Rhizopus* y levadura, encontraron que los pigmentos extraídos eran más puros que los extraídos por los métodos químicos convencionales. Los componentes de estas antocianinas y su estabilidad, no fueron mencionados en el archivo de patentes, sin embargo otros estudios indicaron la estabilidad de estos pigmentos a valores bajos de pH<sup>9</sup>.

En este proceso se produjo una fermentación alcohólica que es una bioreacción que permite degradar azúcares en alcohol y dióxido de carbono. La conversión se representa mediante la ecuación:



Las principales responsables de esta transformación son las levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), las cuales en la anterior reacción realizan una transformación simple, la secuencia de transformaciones para degradar la glucosa hasta dos moles de alcohol y dos moles de bióxido de carbono es un proceso muy complejo, pues al mismo tiempo la levadura utiliza la glucosa y nutrientes adicionales para reproducirse<sup>10</sup>.

<sup>7</sup> KUSKOSKI, E; VEGA, J; RIOS, J; ROSEANE, F; ANA, M and ASUERO, A. Characterization of Anthocyanins from the Fruits of Baguacu (*Eugenia umbelliflora* Berg). En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol 51. (2003); p. 5454.

<sup>8</sup> LONGO, L; SCARDINO, A; VASAPOLLO, G and BLANDO, F. Anthocyanins from *Eugenia myrtifolia* Sims. En: Innovative Food Science and Emerging Technologies. Vol 8. (2007); p. 332.

<sup>9</sup> FAN, G. Op. Cit., 1416

<sup>10</sup> VAZQUEZ, H y ACOSTA, O. Alcoholic fermentation: An option for renewable energy production from agricultural residues. En: Ingeniería Investigación y Tecnología. Vol 8. N° 4. (2007); p. 259.

De igual forma, se pretende realizar un método comparativo con un tercer método, que es mediante extracción asistida por microondas, cuya investigación realizada por YANG, Z et al (2010), indica que es una técnica altamente eficiente y rápida, lo cual es una ventaja frente a la extracción convencional con solventes que es una técnica lenta y de baja eficiencia.

La Extracción asistida por microondas (EAM) utiliza la energía de las microondas para provocar el movimiento molecular y la rotación de líquidos con un dipolo permanente, lo que lleva a un calentamiento rápido del disolvente y la muestra. Tiene ventajas sobre las convencionales técnicas de extracción, como la mejora de la eficiencia, la reducción de la extracción tiempo, el consumo de disolvente de bajo y alto nivel de automatización<sup>11</sup>.

## 2.2 MARCO CONTEXTUAL:

La planta de pomarroso fue caracterizada en el herbario de la Universidad de Nariño como *Eugenia malaccensis*, perteneciente a la familia MYRTACEAE.

*Eugenia malaccensis* fue descrita como un árbol que puede alcanzar alturas entre 10 y 15 metros, es de hojas grandes fusiformes, con flores de coloración rojo intenso. El fruto es de forma globosa con cáscara rojo, de textura lisa y brillante, con pulpa blanca y semilla (FIGURA 1). En Colombia se encuentra en diferentes regiones entre ellas el Amazonas, Putumayo, la costa Pacífica entre otras. En estas zonas la aplicación tradicional que tiene este tipo de frutos es para la elaboración de vinos, refrescos, dulces y mermeladas<sup>12</sup>.



FIGURA 1. Fruto de pomorroso, fuente: ésta investigación.

<sup>11</sup>YANG, Z. Op. Cit.p., 473

<sup>12</sup> INFORMACIÓN DEL POMORROSO. <http://pomorrososano.blogspot.com/>. Consultado 09/12/2013

## 2.3 MARCO TEÓRICO

### 2.3.1 POLIFENOLES y PROPIEDADES:

Los polifenoles son un grupo de compuestos fitoquímicos que se encuentran en muchas plantas comestibles y medicinales, los cuales se diferencian según el grado de insaturación, oxidación y polimerización, lo que puede influir en su actividad biológica <sup>13</sup>.

Este tipo de compuestos se encuentran principalmente en los vegetales con propiedades anti radicales; los cuales protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc, ya que el organismo humano no puede producir estas sustancias protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Este tipo de compuestos se encuentran en muchas plantas, algunas de uso común y son de gran importancia porque poseen propiedades antioxidantes. Además, exhiben una gama de cualidades beneficiosas para la salud; por lo cual pueden incluirse entre los productos de origen natural con valiosas aplicaciones en la medicina tradicional.<sup>14</sup>

En los últimos años, ha cobrado un gran interés la capacidad antioxidante que presentan los polifenoles, especialmente los flavonoides; que son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Este tipo de compuestos se encuentran en alimentos como frutas, hortalizas, tubérculos, bulbos, hierbas, especias, legumbres, té, café<sup>12</sup> y bebidas alcohólicas como el vino que tiene un alto contenido de compuestos polifenólicos, la mayoría de los cuales provienen de la uva y del proceso fermentativo, así como también la cerveza que contiene importantes cantidades de flavonoides, entre los que destacan los polihidroflavanos como catequina y epicatequina, los antocianógenos como leucocianidina o leucopelargonidina y los flavonoles del grupo de quercitinas como kaempferol o mirecitina<sup>15</sup>.

Este tipo de compuestos, desempeñan un papel importante en la biología vegetal; debido a que responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre.

Los flavonoides fueron descubiertos en 1930 por el premio Nobel Szent-György, quien aisló de la cáscara del limón una sustancia llamada citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares, por lo que en principio los flavonoides se denominaron vitamina P por la permeabilidad y también fueron llamados; vitamina C2, porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C. Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950<sup>15</sup>.

<sup>13</sup> HERNÁNDEZ, A; PRIETO, E. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. En: Rev Cubana Invest Biomed. Vol 18. (1999); p. 14.

<sup>14</sup> CULEBRAS, J.M ; MARTINEZ, S; GONZALES; TUÑON, M.J. Plantas que contienen polifenoles. Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. En: Rev Nutrición Hospitalaria. Vol 17. (2002); p. 278.

<sup>15</sup> CAO SHAO-QIAN, PAN SI-YI, YAO XIAO-LIN AND FU HONG-FEI. Isolation and Purification of Anthocyanins from Blood Oranges by Column Chromatography. En: Agricultural Sciences in China. Vol 9 N° 2. (2010); p. 215.

En un principio, los flavonoides fueron considerados sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, pero más tarde se demostraron múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres. Aunque diversos estudios indican que algunos flavonoides poseen acciones prooxidantes, éstas se producen sólo a dosis altas, constatándose en la mayor parte de las investigaciones la existencia de efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías.

Por ello, los pigmentos vegetales desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer<sup>16</sup>.

### 2.3.2 ESTRUCTURA, CLASIFICACIÓN y PROPIEDADES DE LOS FLAVONOIDES

Los flavonoides se sintetizan en las plantas, durante la fase dependiente de luz de la fotosíntesis, donde catalizan el transporte de electrones. Su formación tiene lugar a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina y también de unidades de acetato. La fenilalanina y la tirosina dan lugar al ácido cinámico y al ácido parahidroxicinámico, que al condensarse con unidades de acetato, originan la estructura cinamol de los flavonoides<sup>16</sup>. Por lo tanto, este tipo de compuestos se sintetizan a partir de fenilalanina y la tirosina, combinados con unidades de acetato. Tienen una estructura básica formada por un anillo bencénico, unido a un heterocíclico, el cual, se une al grupo fenil como sustituyente. La estructura química de los compuestos fenólicos, es la que confiere la capacidad para actuar como captadores de radicales libres. Según lo anterior, la capacidad antioxidante de este tipo de compuestos, se determina por parámetros como el tipo de compuesto, el grado de metoxilación y el número de grupos hidroxilo. Por lo tanto, la estructura química de los flavonoides; radica en que son compuestos de bajo peso molecular, con un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano. Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Figura 1)<sup>18</sup>.

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de los grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química, la cual tiene carácter básico; lo que permite una variedad de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. Por lo tanto, en función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.

<sup>16</sup>CULEBRAS, J. Op. Cit.p., 276

<sup>17</sup>REVISTA

DE

[http://www.nutricion.org/publicaciones/revista\\_agosto\\_03/Funcionales/vegetales, vitaminas, polifenoles.pdf](http://www.nutricion.org/publicaciones/revista_agosto_03/Funcionales/vegetales, vitaminas, polifenoles.pdf).  
23/04/2012.

NUTRICIÓN.  
Consultado

<sup>18</sup> KÜHNAU, J. The Flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. En: World Rev Nutr Diet. Vol 24. (1976); p. 190.

3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.

4. Antocianidinas, que tienen un grupo -OH en posición 3 y poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente a la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico. La parte sin azúcares de la molécula flavonoide se llama aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo<sup>19</sup>.

Algunas de las estructuras de los flavonoides mencionados, se pueden observar en la figura 2.

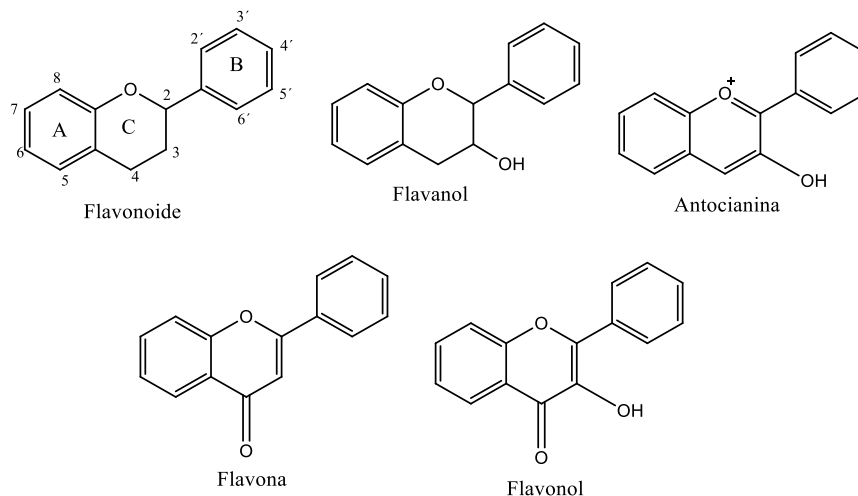


Figura 2. Flavonoides. Estructura básica y tipos, fuente CAO et al, (2010).

La función de este tipo de compuestos, se basa en tres características estructurales:

- a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi;
- b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3;
- c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5<sup>20</sup>.

<sup>19</sup>CAO, S. Op. Cit.p., 213

<sup>20</sup> LETAN, A. The relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivatives. En: J Food Sci. Vol 31. (1966); p.523.

Algunos tipos flavonoides cumplen sólo con algunas de las anteriores características estructurales, como por ejemplo la quercetina presenta las tres características, mientras que la catequina solo presenta la segunda y la diosmetina la primera (figura 3)<sup>21</sup>.

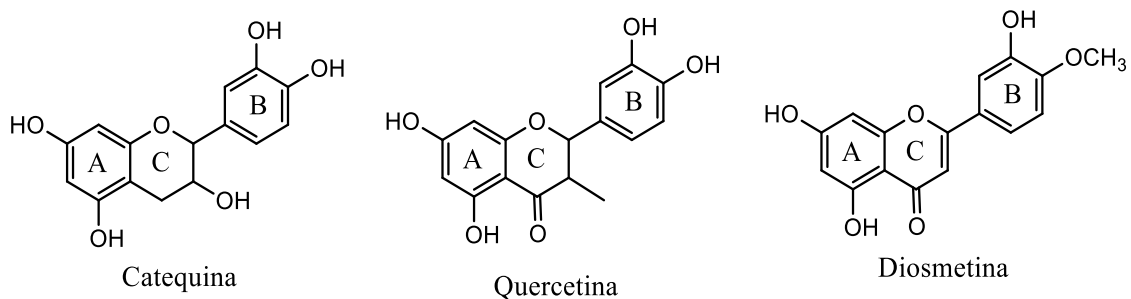


Figura 3. Estructuras de algunos flavonoides, fuente CAO et al, (2010).

Se han identificado más de 5.000 flavonoides<sup>22</sup>, entre los que se pueden destacar:

1. Citroflavonoides: quercitina, hesperidina, rutina, naranjina y limoneno. La quercitina es un flavonoide amarillo-verdoso presente en cebollas, manzanas, brócoles, cerezas, uvas o repollo rojo. La hesperidina se encuentra en los hollejos de las naranjas y limones. La naranjina da el sabor amargo a frutas como la naranja, limón y toronja, y el limoneno se ha aislado del limón y la lima.
2. Flavonoides de la soja o isoflavonoides: están presentes en los alimentos con soja tales como porotos, tofu, tempeh, leche, proteína vegetal texturizada, harina, miso. Los dos más conocidos son la genisteína y la daidzeína.
3. Proantocianidinas: se localizan en las semillas de uva, vino tinto y extracto de corteza del pino marino.
4. Antocianidinas: son pigmentos vegetales responsables de los colores rojo y rojo-azulado de las cerezas.
5. Ácido elágico: es un flavonoide que se encuentra en frutas como la uva y en verduras.
6. Catequina: el té verde y negro son buenas fuentes.
7. Kaemferol: aparece en puerros, brócoles, rábano, endibias y remolacha roja.

<sup>21</sup>CAO, S. Op. Cit.p., 213

<sup>22</sup>ROSS, J.A; KASUM, C.M. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. En: Annu Rev Nutr, vol 22. (2002); p.34.

La capacidad de los polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos; fue reconocida en los años treinta. El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica, ya que pueden unirse los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres, lo cual ha servido para el tratamiento de muchas enfermedades como diabetes, enfermedades cardiovasculares entre otros<sup>23</sup>. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas<sup>24</sup>, así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatoria<sup>25</sup>.

Las propiedades anti-radicales de los flavonoides se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, que son especies químicas altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica<sup>26</sup>, además de esto se ha estudiado la capacidad que tienen para modificar la síntesis de eicosanoides con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria, la prevención de la agregación plaquetaria lo cual implica efectos antitrombóticos y además protegen las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación previniendo la placa de ateroma<sup>27</sup>. Además de los efectos antioxidantes, los flavonoides presentan otras propiedades como la estimulación de las comunicaciones a través de las uniones en hendidura, regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de detoxificación tales como las monooxigenasas dependientes de citocromo P-450, entre otras<sup>28</sup>.

Diversos datos experimentales han demostrado la acción antiproliferativa y anticarcinogénica, así como el papel de agente quimiopreventivo de los flavonoides. Entre los numerosos fenómenos que tienen lugar durante el proceso carcinogénico y que ofrecen opción para la modulación mediante factores externos, se encuentran la formación de metabolitos carcinógenos, que se forman por la acción de enzimas citosólicas y microsómicas<sup>29</sup>.

### 2.3.3 ANTOCIANINAS

En las muchas investigaciones de los flavonoides a lo largo de la historia, se ha comprobado que las fuentes de este tipo de compuestos polifenólicos tienen importantes características organolépticas. Una de estas especies químicas son las antocianinas las cuales se caracterizan porque imparten una gama de colores como rojo, azul y morado, los cuales dan la coloración de las uvas y por consiguiente a bebidas como son los vinos<sup>30</sup>.

<sup>23</sup>CAO, S. Op. Cit.p., 214

<sup>24</sup> VRIJSEN, R; EVERAERT, L; BOETÉ, A. Antiviral activity of flavones and potentiation by ascorbate. En: J Gen Virol. Vol 69. (1988); p.1751.

<sup>25</sup> BRASSEUR, T. Propriétés anti-inflammatoires de flavonoides. En: J Pharmacol Bel. Vol 44. (1989); p. 241.

<sup>26</sup> KONCZAK, I; ZHANG, W. Anthocyanins more than nature's colours. En: Journal of Biomedicine and Biotechnology. Vol 5. (2004); p 240.

<sup>27</sup> YANG, K; LAMPRECHT, S.A. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. En: Journal Carcinogenesis. Vol 21. (2000); p. 1660.

<sup>28</sup> STAHL, W; ALE-AGHA, N; POLIDORI, M.C. Non-antioxidant properties of carotenoids. En: Biol Chem. Vol 383. (2002); p. 558.

<sup>29</sup> HARDIGREE, A.A; EPLER, J.L. Comparative mutagenesis of plants flavonoids in microbial system. En: Mutation Res. Vol 58. (1978); p. 235.

<sup>30</sup> LUCKER, J; MARTENS, S; LUND, T. Characterization of a *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon 3,5-O-methyltransferase showing strong preference for anthocyanins and glycosylated flavonols. En: Phytochemistry. Vol 17. (2010); p. 1484.

Recientemente, las antocianinas han atraído el interés de científicos debido a los atractivos colores presentes en muchos alimentos, además de las propiedades ya mencionadas<sup>31</sup>. Sin embargo estos compuestos presenten inestabilidad causadas por muchos factores, tales como luz, temperatura, oxígeno, pH, etc, lo cual limita su aplicación comercial como colorantes naturales en los productos alimenticios.

Hay un creciente interés en las antocianinas, no sólo como colorantes naturales en la industria alimenticia, sino también como productos farmacéuticos; debido a diversos efectos terapéuticos ya que esta clase de polifenoles también se aplica en la prevención y el tratamiento del glaucoma y otros trastornos de la vista, además se ha encontrado que los extractos ricos en antocianina revelan efecto cardío protector. En consecuencia, recientes estudios científicos han sugerido que las enfermedades cardiovasculares tales como la aterosclerosis; se pueden disminuir por el consumo moderado de vino, en especial el vino tinto, debido a su alto contenido de compuestos fenólicos, entre ellos principalmente antocianinas<sup>32</sup>. Los efectos biológicos mencionados, se deben a la capacidad antioxidante dada por la estructura química que poseen las antocianinas<sup>33</sup>.

Las antocianinas, como un grupo de compuestos fenólicos ampliamente existentes en el reino vegetal, presentan un espectro que va desde naranja a color azul en el medio natural. También poseen propiedades farmacológicas conocidas y se utilizan con fines terapéuticos<sup>34</sup>, además son potentes eliminadores de radicales y son muy eficaces en la inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, que es un paso clave para desarrollo de la aterosclerosis<sup>35</sup>.

#### 2.3.4 MÉTODOS EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS

Las antocianinas, al ser compuestos polares, los hacen solubles en varios tipos de disolventes, tales como metanol, etanol, acetona y agua. La extracción por solvente de antocianinas es el paso inicial previo a la cuantificación, purificación, separación y caracterización<sup>24</sup>, en la mayoría de estudios científicos del análisis de polifenoles. Por lo tanto, los métodos de extracción actualmente empleados utilizan los solventes mencionados. Sin embargo, la estabilidad de estos compuestos fenólicos es fácilmente afectada por las modificaciones estructurales con hidroxilo, metoxilo, glicosilo, especialmente los grupos acilo y por factores ambientales tales como la temperatura y la luz. Por lo tanto, ácidos como clorhídrico o fórmico se añaden a menudo a los disolventes para evitar la degradación de las antocianinas. Esta degradación se debe a que este tipo de compuestos pueden ser encontradas en diferentes formas químicas las cuales dependen del pH de la solución<sup>36</sup>.

<sup>31</sup>CAO, S. Op. Cit.p., 214

<sup>32</sup> DENEV, P; CIZ, M; AMBROZOVA, G; LOJEK, A; YANAKIEVA, I; KRATCHANOVA, M. Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. En: Food Chemistry. Vol 12. (2010); p. 106.

<sup>33</sup> LONG, Y; CHUN-YE, C; XIN, J; MAN-TIAN, M; BIN, Y; HUI, C; WEN-HUA, L; TING, Z. Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity. En: Febs Letter. Vol 584. (2010); p. 590.

<sup>34</sup>FAN, G. Op. Cit.p., 1415



<sup>35</sup>GEMA, F. Op. Cit.p., 4

<sup>36</sup> CHARFUELAN, C. Estudio Químico de la Fracción de Polifenoles Tipo Antocianinas Aislada del Fruto de Ivilan (Monima Obtusifolia), Estabilidad Y Capacidad Antioxidante In Vitro. Trabajo de grado: Universidad de Nariño, departamento de Química (2012).

A pH 1, el catión flavilio (color rojo) es la especie predominante y contribuye a los colores púrpura y rojo (figura 4 A). A valores de pH entre 2 y 4 la especie quinoidal (azul) es la predominante (Figura 4B–D). A valores de pH entre 5 y 6 solamente dos especies pueden ser observadas, las cuales son la seudobase carbinol (Figura 4E) y una chalcona (figura 4F) respectivamente. A valores de pH por encima de 7, las antocianinas son degradadas, dependiendo de sus grupos sustituyentes (Figura 4, reacción de degradación). A valores de pH entre 4 y 6, coexisten cuatro formas estructurales de antocianinas el catión flavilio, la base quinoidal, la base carbinol y la chalcona. El equilibrio entre la base quinoidal y el carbinol ocurre vía el catión flavilio como se muestra en la Figura 4<sup>37</sup>:

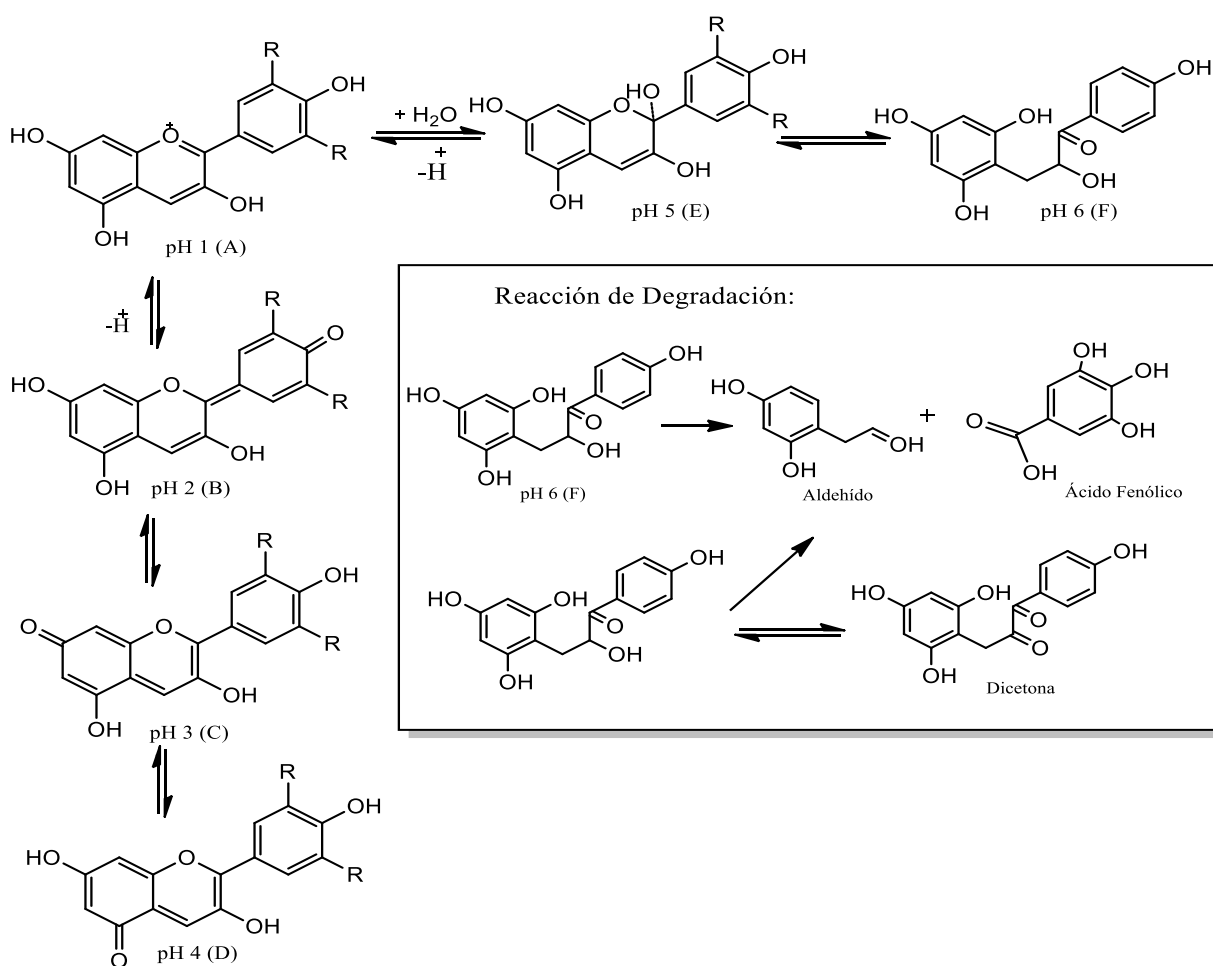


Figura 4. Estabilidad frente al pH de las antocianinas, fuente CHARFUELAN (2012).

<sup>37</sup>ibid., p. 64

Los procedimientos de extracción de pigmentos, son métodos no selectivos y se obtiene un alto rendimiento de subproductos, tales como azúcares, alcoholes de azúcar, pectina, ácidos orgánicos, aminoácidos y proteínas. Algunas de estas impurezas pueden acelerar la degradación de las antocianinas o causan problemas en etapas de procesamiento adicionales, tales como secado por congelación o secado por liofilización. Por otra parte, el bajo contenido de antocianinas en materias primas obstaculiza la producción a gran escala comercial de estos pigmentos.

Por lo anterior existen varios métodos de purificación una de ellas es mediante extracción en fase sólida (SPE) que es un método relativamente simple que permite la eliminación de compuestos no-fenólicos que se consideran impurezas. Este método es muy utilizado ya que es un proceso rápido y económico<sup>38</sup>.

La extracción de antocianinas también puede realizarse por métodos de fermentación con levadura, donde los compuestos de interés son extraídos con mayor grado de pureza que por el método convencional. Por otra parte, durante la fermentación no solo se produce etanol y CO<sub>2</sub> desde el azúcar, si no también metabolitos secundarios tales como alcoholes superiores, éteres etílicos, ácidos grasos<sup>39</sup>.

Otra técnica de extracción es la extracción asistida por microondas (EAM) cuya técnica utiliza la energía de las microondas para provocar el movimiento molecular y la rotación de líquidos con un dipolo permanente, lo que lleva a un rápido calentamiento del disolvente y la muestra. Tiene ventajas sobre los métodos convencionales de extracción, tales como la mejora de la eficiencia, la reducción del tiempo de extracción, bajo consumo de disolvente, y alto nivel de la automatización<sup>40</sup>.

### 2.3.5 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS

El interés en los efectos beneficiosos de las antocianinas en la salud humana ha estimulado una mayor demanda de su uso en productos alimenticios y suplementos dietéticos y creó la necesidad de un método barato y eficaz para cuantificar el total de contenido de antocianina de una muestra. El pH método diferencial ha sido validado y demostrado, es un método sencillo, rápido y preciso para medir el contenido de antocianinas monoméricas de una muestra<sup>41</sup>. Los espectros UV-Vis a diferentes valores de pH ayuda a determinar si las antocianinas están o no polimerizadas. Por lo tanto, la concentración de las antocianinas se determina con la absorbancia por el método del pH diferencial, que se basa en el efecto hipocrómico causado por el cambio de pH y permite la estimación alternativa del contenido de antocianinas monoméricas, incluso en presencia de pigmentos polimerizados y otras interferencias. Este método se basa en la transformación estructural de las antocianinas monoméricas de manera reversible con el cambio de pH (pH 1 coloreado y pH 4.5 incoloro)<sup>42</sup>.

<sup>38</sup>DENEV, P. Op. Cit.p., 102

<sup>39</sup>FAN, G. Op. Cit.p., 1415

<sup>40</sup>YANG, Z. Op. Cit.p., 474

<sup>41</sup> LEE, J; RENNAKER, C; WROLSTAD, R. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. En: Food Chemistry. Vol 110. (2008); p. 786

Para la determinación de antocianinas monoméricas se aplica la siguiente fórmula:

$$A = (A_{\lambda_{max}} - A_{\lambda_{700}})_{pH1} - (A_{\lambda_{max}} - A_{\lambda_{700}})_{pH4.5} \quad (\text{Ecuación 1})$$

En la anterior ecuación  $\lambda_{max}$  corresponde a 518 nm, y el valor de A se reemplaza en la siguiente ecuación para determinar el contenido de antocianinas monoméricas.

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/L)} = \frac{(A * P_m * F_D * 1000)}{\epsilon * l} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

FD: factor de dilución

P<sub>m</sub>: peso molecular de cianidina-3-glucosido=449.2g/mol

ε: Absortividad molar de cianidina-3-glucosido=26900L/mol\*cm

l: espesor de la celda

El peso molecular y el coeficiente de absortividad molar corresponden a la antocianina predominante, si la muestra es desconocida, los resultados se expresan como miligramos de cianidina-3-glucosido (cy-3-glu) en un litro de extracto.

El color polimérico se determina mediante el uso de sistemas tampón, a través del método del pH sustractivo. El empleo de un agente blanqueador como el metabisulfito de sodio y la medición por espectroscopía UV-Vis en las últimas longitudes de onda de 420 nm, 700 nm y la longitud de onda de máxima absorción.

Este método se basa en la reacción de las antocianinas monoméricas con metabisulfito de sodio, experimentando una decoloración, permitiendo determinar la contribución de color por parte de las antocianinas poliméricas, utilizando espectroscopía Uv-vis se determinan índices como:

- a. Densidad de color: expresa el color debido a las antocianinas monoméricas o copolimerizadas presentes y las reacciones de oscurecimiento.
- b. Color polimérico: Expresa el color debido a antocianinas copolimerizadas y reacción de oscurecimiento (color resistente a la decoloración por metabisulfito de sodio).
- c. Color por antocianinas: Expresa el color debido a las antocianinas monoméricas que son decoloradas por metabisulfito de sodio.
- d. Porcentaje de color polimérico: Se define como la relación del color polimérico entre la densidad de color y expresa el porcentaje de color debido al material copolimerizado.

Las ecuaciones utilizadas para estudiar las antocianinas poliméricas son las siguientes<sup>43</sup>:

\_\_\_\_\_

Muestra tratada con agua:

$$\text{Densidad de color (DC)} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{\lambda_{max}} - A_{700})] * FD \text{ (Ecuación 3)}$$

Muestra tratada con metabisulfito:

$$\text{Color polimérico (CP)} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{\lambda_{max}} - A_{700})] * FD \text{ (Ecuación 4)}$$

$$\text{Porcentaje de CP (\%CP)} = \frac{CP}{DC} * 100 \text{ (Ecuación 5)}$$

### 2.3.6 MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE ANTOCIANINAS:

La caracterización de mezclas de antocianinas involucra separación y recolección de cada compuesto, los pigmentos purificados pueden caracterizarse por métodos como espectroscopía de absorción UV-Vis, espectrometría de masas (SM), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y resonancia magnética nuclear (RMN).

La espectroscopía de absorción UV-Vis es la técnica más utilizada debido a su simplicidad y bajo costo, además de proporcionar información cualitativa y cuantitativa, la técnica HPLC con detector de fotodiodos (PDA), ha sido también 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 del método. Por lo que SM, RMN se han convertido en las técnicas preferidas para la identificación de las antocianinas<sup>44</sup>.

a. Espectroscopía de absorción UV-Vis: Las propiedades espectrales son a menudo usadas para la caracterización de antocianinas, especialmente para identificar el tipo de antocianina. El análisis espectrométrico UV es la técnica usada comúnmente para identificar y cuantificar antocianinas. El espectro de absorción de las antocianinas depende del pH.

Esta técnica puede suministrar información relevante de los aspectos estructurales de los flavonoides, es una técnica relativamente barata debido a que solo se necesita una pequeña cantidad de material puro para realizar un análisis espectral. Un ejemplo de esto es la información suministrada para las antocianinas, éste tipo de moléculas presentan dos bandas distintivas de absorción, una en la región UV (260 a 280 nm) y otra en la región visible (490 a 550 nm), adicionalmente la forma del espectro puede dar información sobre el número y la posición de sustituciones glucosídico y la presencia de acilaciones. La relación entre la absorbancia a 440 nm y la absorbancia a la longitud máxima en el espectro visible ( $A_{440}/A_{\lambda_{vis-max}}$ ) es casi el doble de las antocianinas con sustituciones glucosídico en la posición 3 en comparación con aquellas con las sustituciones en las posiciones 3 y 5 o la posición 5 solamente. Es decir si esta relación es cercana o mayor a 0,3, la glicosilación está en posición 3, pero si la relación es menor de 0,2, indica que la antocianina tiene dos glicosilaciones en las posiciones 3 y 5<sup>45</sup>.

---

<sup>44</sup>DENEV, P. Op. Cit.p., 101

<sup>45</sup> JIMENEZ, J; VILLAREAL, J. Estudio químico de pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del motilon (*Hieronima macrocarpa*). Trabajo de grado: Universidad de Nariño, departamento de Química (2008).

Adicionalmente la presencia de sustituciones glucosídicos en otras posiciones (por ejemplo, 3,7-diglycosides) pueden ser reconocidos debido a que presentan una curva espectral diferente a las que presentan las antocianinas con los patrones de sustitución común.

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, la relación de absorbancia a estas longitudes de onda ( $A_{max-acil}/A_{\lambda vis-max}$ ) da una estimación de la presencia de grupos de acilación de la siguiente manera, si esta relación es menor de 0,4 no hay acilación, entre 0,5 y 0,7 hay acilación. Este tipo de relaciones también se pueden presentar en términos de porcentaje (%). 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.

#### b. HPLC en fase reversa

La técnica empleada más comúnmente hoy en día es la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) puesto que ésta permite la separación simultánea, la identificación y cuantificación de los compuestos de antocianinas sin requerir una alta pureza de los extractos<sup>46</sup>. Los sistemas de elusión son binarios, usando solventes acidificados acuosos tales como ácido acético, ácido perclórico o ácido fórmico en un solvente orgánico tal como metanol o acetonitrilo<sup>47, 48</sup>. Las antocianinas separadas son detectadas y cuantificadas a una longitud de onda de 525 nm y la identificación está basada en los tiempos de retención correspondientes y espectros ultravioleta-visibles (UV-Vis) comparado con la de los estándares auténticos puros tales como delfinidina-3-glucósido, delfinidina-3-rutinósido, cianidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, cianidina-3-rutinósido, peonidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido, pelargonidina -3-glucósido y cloruro de cianidina que están comercialmente disponibles.

#### c. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una técnica usada comúnmente que permite la identificación de antocianinas determinando la masa de los iones moleculares en la muestra y los fragmentos de la separación de estos compuestos a través de la aplicación de energías ionizantes<sup>46</sup>.

La HPLC-SM combina la separación sobre el sistema de la cromatografía líquida con la selectividad y sensibilidad del detector SM permitiendo la identificación de componentes individuales de una mezcla de compuestos tales como extractos de plantas o fluidos biológicos<sup>49</sup>.

<sup>46</sup>ibid., p. 59

<sup>47</sup>ESCRIBANO, B; BEULGA, S; RIVAS, G. Anthocyanins in Cereals. En: Journal Chromatography. Vol 1054. (2004); p.141.

<sup>48</sup>ZHANG, Y; JAYAPRAKASAM, B; SEERAM, N; OLSON, L; DEWITT, D; NAIR, M. Insulin Secretion and Cyclooxygenase Enzyme Inhibition by Cabernet Sauvignon Grape Skin Compounds. En: Journal Agricultural and Food Chemistry. Vol 52. (2004); p.233.

<sup>49</sup> HORBOWICZ, M; KOSSON, R; GRZESIUK, A; DEBSKI, H. Anthocyanins of Fruits and Vegetables-their occurrence, analysis and role in human nutrition. En: Vegetables Crops Research Bulletin. Vol 68. (2008); p.22

La ESI-SM es usada para la caracterización de antocianinas en matrices alimenticias complejas y es especialmente útil para la detección de metabolitos de antocianinas de nivel bajo en plasma humano.

El análisis de las antocianinas por espectrometría de masas tiene diferentes propósitos, entre ellos elucidación estructural, el estudio de las transformaciones del color rojo en el añejamiento del vino, polimerizaciones y reacciones con otros flavonoides.

Recientemente, las técnicas acopladas tales como HPLC-MS, APCI-MS, FAB-MS y ESI-MS se han convertido en herramientas muy poderosas para la identificación de las antocianinas<sup>50</sup>.

En las últimas dos décadas, se han desarrollado numerosos métodos de ionización para muestras no volátiles y termodinámicamente inestables, como las antocianinas. Entre estas fuentes de ionización se encuentra FAB, ESI y MALDI, que se consideran fuentes de ionización suave, ya que causa la fragmentación muy baja y permiten determinaciones de pesos moleculares exactos. Estos métodos de ionización evitan la volatilización y posterior ionización y suministro de energía a la muestra sólida o líquida de diferentes maneras, de tal modo que haya formación directa de iones en fase gaseosa<sup>51</sup>.

### 2.3.7 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales son el ensayo de la vainillina y el de Folin-Ciocalteu. El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotungstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotungstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula. La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de fruta<sup>51</sup>.

Aunque el método de Folin Cicolteau es un método sencillo y rápido para la determinación de fenoles totales en una muestra, puede presentar interferencias debido a compuestos como azúcares, aminas aromáticas, dióxido de azufre, ácido ascórbico, ácidos orgánicos, y Fe (II). Además de ello hay sustancias orgánicas de tipo no fenólico adicionales que pueden reaccionar con el reactivo de Folin Cicoletau entre ellas se encuentra la adenina, adenosina, alanina, anilina, ácido aminobenzoico, ácido ascórbico, benzaldehído, creatinina, cisteína, citidina, citosina, dimetilanilina, EDTA, fructosa, guanina, guanosina, glicina, histamina, histidina, indol, metilamina, ácido nitriloacético, ácido oleico, feniltiourea, proteínas, piridoxina, sacarosa, ácido sulfanílico, tiourea, timina, timidina, trimetilamina, triptófano, uracilo, ácido úrico, y xantina<sup>51</sup>.

<sup>50</sup>COSTA, C; HORTON, D; MARGOLIS. Analysis of Anthocyanins in Foods by Liquid Chromatography, Liquid Chromatography-mass Spectrometry and Capillary Electrophoresis. En: Journal Chromatography. Vol 881. (2000); p.410.

<sup>51</sup>CHARFUELAN, C. Op. Cit.p., 72

Además, algunas sustancias inorgánicas tales como la hidrazina, sulfato de hierro, amonio y manganeso, nitrito de potasio, cianuro de sodio, metabisulfito de sodio, fosfato de sodio, sulfito de sodio, y cloruro de estaño también pueden reaccionar con el reactivo de Folin Cicoletau para dar concentraciones elevadas de compuestos fenólicos aparentes<sup>52</sup>.

### 2.3.8 DISEÑO EXPERIMENTAL ALEATOREAMENTE COMPARATIVO:

Este tipo de diseño se usa cuando los datos tienen pequeña variación, y además cuando el número de tratamientos también es pequeño.

Si se tiene N-tratamientos, y se quiere ubicar n-elementos para los N-tratamientos se procede de la siguiente manera:

Se eligen aleatoriamente n-unidades experimentales para aplicarle un tratamiento t, luego se tiene n-elementos de las Nn-n (número de mediciones) restantes para aplicarles el tratamiento t2 y así sucesivamente hasta agotar las unidades experimentales.

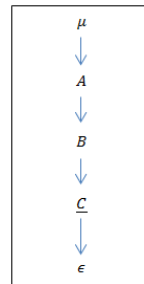


Figura 5. Estructura del diseño experimental, fuente ésta investigación.

En este diseño  $\mu$  representa la media experimental, A, B y C son los factores y  $\epsilon$  es el error experimental. El factor aleatorio C está anidado en el factor B y este a su vez en el factor A; no hay factores cruzados

El modelo asociado en el diagrama es:

$$y_{ijkl} = \mu + A_i + B_{j(i)} + C_{k(ij)} + \epsilon_{k(ij)} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde  $i=1,2,\dots,27$ ,  $j=1,2,\dots,27$  y  $k=1,2,\dots,27$

Los parámetros i, j y k corresponden a las variables.

En este tipo de diseño de experimentos se tiene en cuenta diferentes tipos de pruebas estadísticas que se mencionan a continuación<sup>53</sup>:

<sup>52</sup> PRIOR, R; WU, X and SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 53 N°10. (2005); p. 4290-4302.

<sup>53</sup> SEVERO PALACIOS. Estadística experimental aplicada a ciencias e ingeniería. Ed. CONCYTEC. Consejo Nacional de ciencia, tecnología e innovación tecnológica. Ministerio de educación Perú; p. 50.

### 2.3.8.1 MEDIDAS DE CENTRALIDAD:

Una medida de tendencia central es un número que representa el valor central de un conjunto de valores. Habitualmente, estas medidas se llaman promedios. Las herramientas estadísticas que más comúnmente se usan son:

2.3.8.1.1 Media aritmética: Generalmente se le llama media o promedio que es la suma de una serie de datos numéricos dividida por el número total de ellos.

Es apropiado usar la media cuando los resultados son simétricos y tienen una distribución normal. Este parámetro se encuentra con la siguiente ecuación:

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n} \quad i = 1, 2, \dots, n \quad (\text{Ecuación 7})$$

### 2.3.8.2 MEDIDAS DE DISPERSIÓN:

Las medidas de dispersión nos van a informar sobre el grado de variabilidad de la distribución, es decir, nos van a decir si los valores que aparecen están más o menos concentrados. Por tanto, nos van a informar también sobre el grado de representatividad de la medida de posición, pues cuanto más concentrados estén los valores que toma la variable mejor representará un solo valor a toda la distribución.

La varianza es una medida de dispersión que mide el grado de esparcimiento de una distribución alrededor de la media aritmética. Cuanto más grande sea la varianza más esparcidos estarán los valores de la variable. La varianza se suele notar  $\sigma^2$  y se calcula:

$$\sigma^2 = \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2 n_i}{N} = \sum (X_i - \bar{X})^2 f_i \quad (\text{Ecuación 8})$$

$X_i$  representan a los valores de la variable si es una distribución no agrupada y a las marcas de clase si es una distribución agrupada en intervalos.

La varianza es la suma de las desviaciones de los valores de la variable sobre la media aritmética ponderada por las frecuencias. Por lo tanto, cuanto menor sea la varianza más agrupada estará la distribución en torno a su media aritmética.

La varianza viene expresada en las mismas unidades que la variable pero al cuadrado.

2.3.8.2.1 Desviación típica: La desviación típica se define para obtener una medida de dispersión que venga expresada en las mismas unidades que la variable. Se define como la raíz cuadrada de la varianza<sup>54</sup>.

$$\sigma = \sqrt{\sigma^2} \quad (\text{Ecuación 9})$$



<sup>54</sup>ibid., p. 31

2.3.8.2.2 Coeficiente de variación: Tanto la varianza como la desviación típica son medidas de dispersión absoluta, es decir, hablan de la dispersión de la variable que se estudia, pero no permiten comparar la dispersión de dos distribuciones distintas.

El coeficiente de variación es una medida de dispersión relativa que va a permitir comparar dos distribuciones distintas, se define como el cociente entre la desviación típica y la media aritmética.

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} \quad (\text{Ecuación 10})$$

El coeficiente de variación es un coeficiente adimensional y solo se puede definir cuando la media aritmética es distinta de cero.

Para comparar la dispersión de dos distribuciones basta con comparar sus coeficientes de variación, aquella que su coeficiente de variación sea menor es la que está más concentrada en torno a su media aritmética.

#### 2.3.8.3 DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS:

Se utiliza para comparar resultados entre muestras. Las comparaciones más comunes son:

- Dos o más subgrupos dentro de una misma muestra
- Muestras tomadas en diferentes puntos en el tiempo

Antes de hacer una prueba estadística, se debe tener una hipótesis es decir una relación que probar como verdadera o falsa. Usualmente se supone que dos poblaciones son iguales hasta que se pruebe lo contrario. Esto se llama hipótesis nula.

En la hipótesis nula, si la diferencia entre dos muestras es lo bastante pequeña como para que fácilmente pudiera haber ocurrido por azar, entonces la hipótesis nula no puede ser rechazada y la diferencia entre las dos muestras no es estadísticamente significativa. En cambio, si la diferencia en los resultados de la toma de datos es tan grande que no es factible que esto haya ocurrido por azar, se rechaza la hipótesis nula y la diferencia entre las dos muestras es estadísticamente significativa<sup>33</sup>.

#### 2.3.8.4 DISPERSIÓN DE LOS DATOS:

2.3.8.4.1 Datos no agrupados: La varianza también se basa en desviaciones a partir de medias. Para hallar la varianza de un producto, se aplica la siguiente ecuación<sup>55</sup>:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n}} \quad (\text{Ecuación 11})$$

<sup>55</sup>ibid., p. 31

2.3.8.4.2 Grados de libertad (GL): Esta cantidad permite tener en cuenta y corregir, desde el punto de vista matemático, las restricciones impuestas a los valores. En este caso al calcular la desviación estándar, el número n de observaciones ésta fijado y la desviación estándar estimada se puede calcular a partir de la media. De n observaciones sólo n-1 pueden variar, el último valor queda determinado por X y n. Por lo tanto, al estimar la desviación estándar a partir de una muestra de la población de datos, solo hay n-1 grados de libertad. Elevando al cuadrado la desviación estándar estimada se tiene la varianza estimada  $s(x)^2$ .

#### 2.3.8.5 DISTRIBUCIONES:

Al tratar con grandes cantidades de datos, es conveniente ordenarlos de tal manera que la frecuencia de la aparición de rangos de valores dados, puedan ser tabuladas y graficadas<sup>34</sup>.

Este ordenamiento se realiza estableciendo rangos llamados intervalos de clase la frecuencia relativa, de los intervalos de clase se denomina distribución empírica y se utilizan para estimar las distribuciones teóricas.

Existen varios tipos de ensayos estadísticos que se emplean para determinar si la diferencia entre dos conjuntos de valores es real y significativa o a errores azarísticos.

2.3.8.5.1 Ensayo t: La distribución t de Student aparece al comprobar la hipótesis de la media de una totalidad general de distribución normal siendo incógnita la varianza.

$$f(X) = \frac{\Gamma\left(\frac{n+1}{2}\right)}{\sqrt{n\pi}\Gamma\left(\frac{n}{2}\right)} \left(1 + \frac{X^2}{N}\right)^{\frac{1-n}{2}} \text{ (Ecuación 12)}$$

2.3.8.5.1 Chi-cuadrado: Esta prueba puede utilizarse para comparar los resultados de una encuesta con frecuencia teórica o esperada.

$$X^2 = \frac{\sum(f - f')^2}{f'} \text{ (Ecuación 13)}$$

2.3.8.5.2 Prueba de Shapiro-Wilk: Se basa en la comparación de los cuantiles de la distribución normal ajustada con los cuantiles de los datos y la prueba de sesgo estandarizado.

#### 2.3.8.6 INTERVALOS DE CONFIANZA:

El desarrollo del análisis estadístico implica la determinación teórica de la distribución de ciertos valores, como el valor medio, la desviación estándar y la varianza, que se puede esperar si sólo actúa al azar. Por definición<sup>56</sup>:

<sup>56</sup>ibid., p. 33

Tabla 1. Intervalos de confianza.

<i>Reordenando</i>	<i>Intervalo de confianza</i>
$\mu = \frac{\pm Z\sigma}{\sqrt{n}} + \bar{X}$	$\pm Z = \bar{X} - \frac{\mu}{\sigma/\sqrt{n}}$

Por lo tanto, para un cierto nivel de probabilidad que determina el valor de Z, puede afirmarse que el intervalo de confiabilidad de  $\mu$  estará dado por,

$$\bar{X} - \frac{Z\sigma}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{X} + \frac{Z\sigma}{\sqrt{n}} \text{ (Ecuación 14)}$$

Si no se conoce la desviación estándar verdadera, aún puede determinarse un intervalo de confiabilidad. Esta estimación utiliza la distribución t en lugar de la distribución Z porque el concepto t incluye la variación adicional introducida por la estimación de la desviación estándar, reordenando:

$$\bar{X} - \frac{tS(X)}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{X} + \frac{tS(X)}{\sqrt{n}} \text{ (Ecuación 15)}$$

### 2.3.8.7 ANÁLISIS DE REGRESIÓN

Se ocupa de desarrollar una cierta relación matemática que incluye el modelo matemático, su significación estadística y su confiabilidad.

#### 2.3.8.7.1 MÉTODOS DE MÍNIMOS CUADRADOS

Se predice una variable dependiente en función de una variable independiente simple; en muchos problemas de este tipo la variable independiente se observa sin error o con error que es despreciable se compara con el error de la variable independiente.

2.3.8.7.1.1 Regresión lineal simple: Determina la relación entre una sola variable de regresión X y la respuesta Y. Usualmente se supone que la variable X es continua y controlada por el investigador. Si el experimento está diseñado se eligen los valores X y se observan los valores correspondientes a Y.

El valor esperado de Y para cada valor de X es:

$$E(Y/X) = b_0 + bX \text{ (Ecuación 16)}$$

En donde los parámetros de la recta  $b_0$  y  $b$  son constantes desconocidas.

2.3.8.7.1.2 Estadístico R-Cuadrado: Es adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes.

2.3.8.7.1.3 Estadístico de Durbin-Watson (DW): Prueba los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa<sup>57</sup>.

<sup>57</sup>ibid., p. 34

### 2.3.8.8 PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA

No se puede utilizar la prueba t para verificar la hipótesis conjunta según la cual las pendientes de las distintas variables son simultáneamente cero. Sin embargo, esta hipótesis conjunta puede verificarse mediante la técnica de ANOVA y puede demostrarse del modo siguiente.

$SC_{total} = SC_{error} + SC_{residual}$   $SC_{total}$  tiene como es costumbre  $N-1$  grados de libertad.

$SC_{residual}$  tiene  $N-3$  grados de libertad por motivos ya conocidos y

$SC_{error}$  tiene 2 grados de libertad en razón de que es función de  $b_1$  y  $b_2$ .

Por lo tanto, siguiendo el procedimiento ANOVA, se puede elaborar la tabla<sup>58</sup>:

$$F = \left[ (b_1 \sum Y_i X_{1i} + b_2 \sum Y_i X_{2i}) / 2 \right] / \sum \varepsilon_i^2 / (N-3) \quad (\text{Ecuación 17})$$

Tabla 2. Análisis de varianza.

Fuente	SC	GL	CM	F <sub>o</sub>
Regresión	$b_1 \sum Y_i X_{1i} + b_2 \sum Y_i X_{2i}$	2	$SC/GL$	$(SC/GL) / \sigma^2$
Error	$\sum \varepsilon_i^2$	$N-3$		
Total	$\sum Y_i^2$	$N-1$	$R^2 = b_1 \sum Y_i X_{1i} + b_2 \sum Y_i X_{2i} / \sum Y_i^2$	

<sup>58</sup>ibid., p. 35

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.0 Equipos y reactivos:

TABLA 3. Equipos y reactivos

EQUIPOS	REACTIVOS	MATERIALES
Rotaevaporador	Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Microondas para extracción reflujo	Ácido clorhídrico	Amberlita XAD-7 sigma
Autoclave	Ácido cítrico	Lipophilic sephadex LH-20
Estufa	Reactivo de Folin	Columna X-terra C18
Centrifuga	Carbonato de sodio	Columna shimadzu premier C 18
Uv-Vis Pharo Merck	Ácido gálico	
HPLC Waters DAD	Cloruro de potasio	
HPLC-IT-TOF	Ácido acético	
	Acetato de sodio	
	Metabisulfito de sodio	
	n-hexano	
	Acetato de etilo	
	Metanol	
	Ácido fórmico	
	Acetonitrilo	
	Ácido acético	

#### 3.1 Recolección del material vegetal:

La recolección se realizó en el municipio de Puerto Asís en el departamento del Putumayo cuya zona se ubica a 250 msnm, es una zona con un clima tropical húmedo<sup>59</sup>. El muestreo de forma aleatoria en una hectárea de terreno en árboles silvestres. Se tomó una cantidad de 5 Kg de frutos, donde se escogió los frutos con la tonalidad de color más intensa y mayor estado de maduración, obteniéndose así 3 Kg de muestra seleccionada, a la que posteriormente se realizó la separación de cáscara de la pulpa, dando como resultado final una muestra de 906,2 g de cáscara.

#### 3.2 Obtención del extracto crudo de la cáscara del fruto:

Para realizar los tres métodos de extracción y realizar una comparación entre ellos, se realizó por triplicado cada extracción partiendo de 100 g de cáscara de fruto.

#### 3.3 Extracción convencional con solventes:

Las tres muestras de 100 g de cáscara de fruto se sometieron al mismo proceso siguiendo la metodología propuesta por Gongjian Fan et al (2008)<sup>60</sup> con algunas variaciones.

<sup>59</sup> [www.putumayo.gov.co/54-portal-principal/municipios.html](http://www.putumayo.gov.co/54-portal-principal/municipios.html). Consultado: 10/12/2013.

<sup>60</sup> FAN, G. Op. Cit.p., 1414

Las muestras se maceraron en recipientes por separado con una solución de etanol 95% y ácido clorhídrico 0.05N en relación 15:85, por 24 horas a temperatura ambiente en ausencia de luz, este proceso se repitió por 8 veces, se filtró y se llevó a sequedad a 40°C por medio de un rotaevaporador. El producto obtenido se denominó extracto crudo obtenido con solventes (ES).

#### 3.4 Extracción asistida con microondas:

De igual forma que la extracción con solventes, las tres muestras de cáscara de fruto se sometieron al mismo proceso, en este caso se siguió la metodología propuesta por Zhendong Yang et al (2010)<sup>61</sup>, utilizándose las condiciones óptimas encontradas en esta investigación. La muestra vegetal se introdujo en un balón provisto de un sistema de refrigeración y se llenó con una solución de etanol 95% y ácido clorhídrico 1.5M en relación 15:85, se extrajo en un equipo microondas por 19 minutos a 555 watos, se filtró y se repitió el proceso por 8 veces, se llevó a sequedad con rotaevaporador y el producto se denominó extracto crudo obtenido de extracción asistida con microondas (EAM).

#### 3.5 Extracción mediante fermentación alcohólica.

Como en las anteriores extracciones, las muestras de material vegetal se sometieron al mismo proceso por separado, siguiendo la metodología propuesta por Gongjian Fan et al (2008)<sup>62</sup>, con algunas modificaciones. El material vegetal se lavó con agua destilada previamente esterilizada y se maceró con una solución de ácido cítrico estéril inoculado con 4 g de *Saccharomyces cerevisiae* y se fermentó a 30°C por 72 horas en una estufa. Posteriormente, se centrifugó a 1776 rpm por 20 minutos y se concentró el sobrenadante a 40°C en un rotaevaporador, el proceso se repitió por 8 veces. El material de vidrio utilizado en esta metodología fue igualmente esterilizado en autoclave. El producto se denominó extracto crudo obtenido por fermentación alcohólica (EFA).

3.6 Determinación de fenoles totales: Se determinó el contenido de fenoles totales con el método publicado por Follin Ciocateau (1927)<sup>63</sup>, a los extractos crudos de las muestras por triplicado; de las tres metodologías propuestas a una igual concentración de 1120ppm.

De las soluciones de los extractos se tomó 0,1 mL en un balón aforado de 10 mL y se adicionó 0.5 mL del reactivo de Folin, después de 30 segundos y antes de 8 minutos se adicionó 1.5 mL de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20% p/v, se aforó con agua destilada y se dejó reposar por 2 horas en baño maría a 24°C, posteriormente se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Vis.

De igual forma se preparó una curva de calibración utilizando soluciones de 50, 100, 150, 250 y 500 ppm de ácido gálico por lo tanto los resultados se expresaron en mg de ácido gálico/100 g de fruta. El proceso se realizó por triplicado.

<sup>61</sup> YANG, Z. Op. Cit.p., 474

<sup>62</sup> FAN, G. Op. Cit.p., 1414

<sup>63</sup>CHARFUELAN, C. Op. Cit.p., 48



3.7 Cuantificación de antocianinas monoméricas: El contenido de antocianinas monoméricas se determinó a través del método del pH diferencial, se realizó por triplicado a las muestras de los extractos crudos partiendo de soluciones de 0.5 % p/v, las cuales se ajustaron a pH 1 y pH 4.5 con ayuda de soluciones de KCl/HCl 0.025 M y CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa 0.4 M respectivamente.

Se determinó la longitud de onda máxima y el factor de dilución con la solución a pH 1, posteriormente se midió la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción y a 700 nm en un espectrofotómetro UV-Vis. La cantidad de antocianinas monoméricas se expresó como equivalentes de cianidina-3-glucósido/100 g de fruto<sup>64</sup>.

3.8 Cuantificación de antocianinas poliméricas: Para la cuantificación de antocianinas poliméricas se realizó el método del pH sustractivo por triplicado para cada muestra de los extractos crudos. Se prepararon soluciones de los extractos utilizando como solvente KCl/HCl 0.025 M a pH 1, tomando como referencia las concentraciones, factores de dilución y longitud de onda máxima utilizada para el método de cuantificación de antocianinas monoméricas. Se midió 2.5 mL de muestra diluida en 2 tubos de ensayo, a uno de ellos se adicionó 0.2 mL de metabisulfito de sodio 40% en agua y al segundo se adicionó 0.2 mL de agua destilada, posterior a 15 minutos se midió la absorbancia a 420 nm, a la longitud de onda de máxima absorción y 700 nm en un espectrofotómetro UV-Vis<sup>64</sup>.

3.9 Determinación del método de extracción más eficiente: Para determinar el mejor método de extracción entre los tres evaluados por espectroscopía ultravioleta visible, se realizó un diseño experimental aleatoriamente comparativo utilizando el programa startgraphics Centurion XV, en donde las variables de respuesta que se tuvo en cuenta para realizar la debida comparación fueron: resultados de fenoles totales, cantidad de antocianinas monoméricas y cantidad de antocianinas poliméricas para los extractos crudos.

Para realizar la comparación de los métodos de extracción en el contenido de antocianinas poliméricas, se realizó una transformación de los datos de porcentaje de color polimérico debido a que es un índice. Se utilizó la siguiente ecuación:

$\text{arcoccos } \sqrt{x}$  , donde x son los índices de color polimérico.

3.10 Purificación del extracto crudo: El extracto del cual se obtuvo los mejores resultados (determinado estadísticamente), se sometió a los siguientes procesos:

3.10.1 Separación de compuestos lipofílicos y medianamente polares: El extracto crudo, se disolvió en 50 mL de agua destilada, se realizó lavados por triplicado con 20 mL de n-hexano y 20 mL de acetato de etilo con el fin de eliminar compuestos lipofílicos y medianamente polares<sup>64</sup>.

<sup>64</sup> ibid.p., 48

3.10.2 Obtención del extracto rico en antocianinas: El extracto parcialmente purificado se cargó en una columna cromatográfica empacada con amberlita XAD-7 SIGMA (resina no polar, no iónica) como fase estacionaria, y como fase móvil para la elución de los compuestos incoloros de baja polaridad se utilizó 3 L de agua destilada para cada extracto, posteriormente se eluyó el extracto retenido en la columna con una solución de etanol 95%-HCl 0.05N en relación 85:15, se concentró a sequedad a 40°C.

3.10.3 Separación de antocianinas monoméricas y poliméricas: Se diluyó el extracto rico en antocianinas en metanol y se utilizó una columna cromatográfica utilizando como fase estacionaria una resina Lipophilic Sephadex LH-20, para eluir el extracto de antocianinas monoméricas se utilizó como fase móvil una mezcla de metanol/ácido fórmico al 0.1 % en relación 1:4. El extracto de antocianinas poliméricas se eluyeron con acetona/ácido fórmico al 0.1% en relación 2:1. Seguido de la separación de las fracciones se concentró a 40°C en un rotaevaporador<sup>65</sup>.

### 3.11 Identificación química de los componentes mayoritarios

3.11.1 Análisis por HPLC: La identificación química de los constituyentes antocianicos mayoritarios se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) de tipo analítica que se realizó para el extracto crudo, puro y las fracciones separadas de antocianinas monoméricas.

Se usó como fase estacionaria una columna C 18 y como fases móviles agua, acetonitrilo y ácido fórmico en relación 87:3:10 denominado solvente A y agua acetonitrilo y ácido fórmico en relación 40:50:10 denominado solvente B, los cuales fueron desgasificados y filtrados.

Se acondicionó el sistema dejando correr un flujo de 0.5 mL/min durante 10 minutos al 100% de cada solvente. Se utilizó 1 mL de fase móvil A para disolver 1 mg de cada una de las muestras y se filtraron con un cartucho de 0.45 µm de diámetro poro. Se empleó un flujo de 0.8 mL/minuto y un volumen de inyección de 20 µL. El gradiente cromatográfico utilizando se indica en la siguiente tabla<sup>65</sup>:

Tabla 4. Gradiente HPLC analítica.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	94	6
10	80	20
20	60	40
30	50	50
35	94	6

<sup>65</sup> ibid.p., 49

3.11.2 Análisis por HPLC-MS Para analizar químicamente los constituyentes mayoritarios en el extracto puro de polifenoles del fruto de pomarrosa, se realizó un análisis por LCMS de alta resolución en modo ESI.

La muestra fue analizada de acuerdo con la metodología propuesta por Osorio et al; (2012), con algunas modificaciones. La fase estacionaria fue una columna C18 y se utilizó como fase móvil una solución A que contenía acetonitrilo, ácido acético y agua en proporción 3:10:87 (v/v/v) y una solución B de acetonitrilo, ácido acético y agua en proporción 50:10:40 (v/v/v). El flujo fue de 0,25 mL/min, con una inyección de 10 µL.

Tabla 5. Gradiente HPLC-SM.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	90	10
20	70	30
25	50	50
30	90	10

El análisis de SM se realizó a una temperatura de 230°C, un voltaje del detector de 1,95 kV, un rango de 50-800 m/z, un tiempo de acumulación de iones de 10 msec, energía de 15% y un flujo de N<sub>2</sub> de 1,5 L/min<sup>66</sup>.

---

<sup>66</sup> OSORIO, C; HURTADO, N; DAWID, C; HOFMANN, T; HEREDIA, F and MORALES, A. Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes Berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits. En: Food Chemistry. Vol 132. (2012); p. 1915-1921.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL:

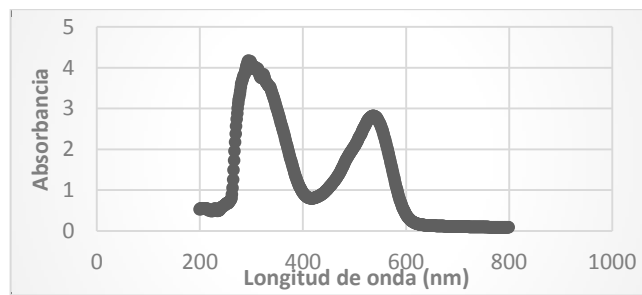
Una vez seleccionado aproximadamente 3,0 kg de fruto de tamaño y coloración similar, se procedió a retirar de forma manual la cáscara que era el objetivo de la investigación. Se encontró que el porcentaje de cáscara por fruto era de 29,35%. Se partió de una cantidad de cáscara de fruto de 906,156 g, por lo cual se tomaron muestras de 100 g de cáscara para cada extracción, teniendo en cuenta que al ser una investigación aleatoriamente comparativa, los procesos se realizaron por triplicado.

### 4.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN:

Durante el proceso de extracción, siguiendo las metodologías descritas en el apartado 3.2, se analizó el perfil del espectro UV-Vis del extracto crudo con el fin de confirmar la presencia de los polifenoles (antocianinas) en la cáscara del fruto.

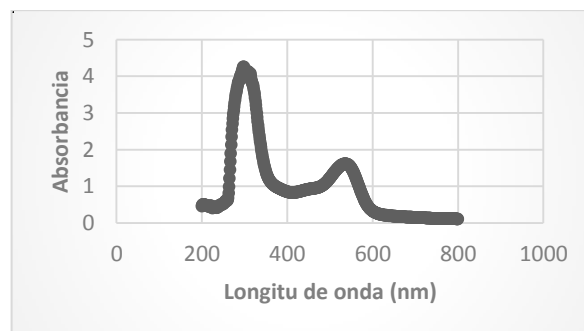
El método 1 de extracción, corresponde a la extracción con solventes (ES), que es la metodología tradicional que se realiza para obtener este tipo de compuestos.

GRÁFICO 1. Espectro UV-Vis del extracto de antocianinas del pomarroso (ES), fuente ésta investigación.



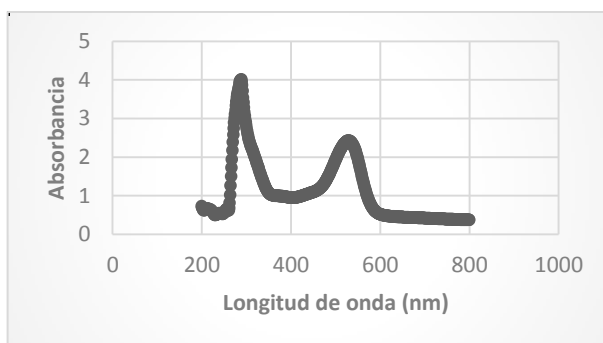
El método 2 de extracción, corresponde a la extracción asistida con microondas (EAM).

GRÁFICO 2. Espectro UV-Vis del extracto de antocianinas del pomarroso (EAM) fuente ésta investigación.



El método 3 de extracción, corresponde a la extracción por fermentación alcohólica (EFA).

GRÁFICO 3. Espectro UV-Vis del extracto de antocianinas del pomarroso (EFA), fuente ésta investigación.



Los anteriores espectros indican el perfil característico de las antocianinas, el cual presenta dos bandas distintivas, una en la región UV debida a la conjugación del anillo A y otra en la región visible debida al anillo B (Figura 1).

Lo anterior confirmó la presencia de antocianinas en la cáscara del fruto de pomarroso, por lo cual se procedió a realizar las extracciones establecidas de una forma aleatoriamente comparativa, es decir, la cantidad de cáscara de fruto inicial fue 100 g para cada muestra y el número de réplicas fueron las mismas para los tres métodos.

La siguiente tabla indica la cantidad de extracto crudo (EC) obtenido en cada caso:

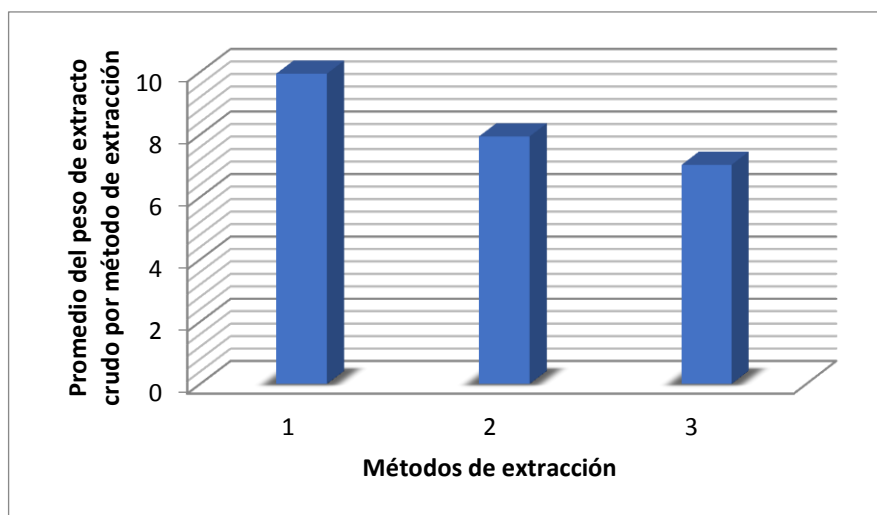
TABLA 6. Pesos de extracto crudo de pomarroso.

Peso del extracto crudo (g)								
Extracción con solventes (ES)			Extracción asistida con microondas (EAM)			Extracción por fermentación alcohólica (EFA)		
M1	M2	M3	M1	M2	M3	M1	M2	M3
11,0	9,9	10,0	8,2	7,7	7,9	7,5	7,0	6,6
$\bar{x}$		DS	$\bar{x}$		DS	$\bar{x}$		DS
10,3		0,6	7,9		0,3	7,0		0,5

Donde M indica la Muestra y su número,  $\bar{x}$  es el promedio y DS la desviación estandar.

Como se puede ver en la anterior tabla, ES (método 1) fue la técnica con la que se obtuvo mayor contenido de extracto crudo, seguido por EAM (método 2). EFA (método 3), fue la técnica donde se obtuvo menor cantidad de extracto crudo, como se evidencia en la siguiente gráfica de barras.

GRÁFICA 4. Promedio del peso de extracto crudo para cada método de extracción, fuente ésta investigación.



#### 4.3 EVALUACIÓN DE LOS EXTRACTOS MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA UV-Vis:

##### 4.3.1 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES:

Se determinó el contenido de fenoles totales a los extractos crudos de ES, EAM y EFA, con el método de Folin Ciocalteu.

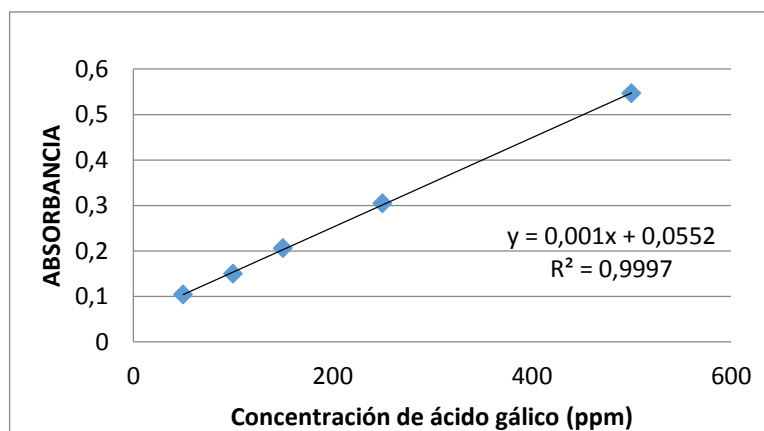
La siguiente tabla indica los datos para los patrones de ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin Ciocalteu, las mediciones se realizaron por cuadruplicado para obtener mejores resultados. Se obtuvo una ecuación de la recta de  $y=0,001x+0,0552$ , con un coeficiente de determinación de 0,9997 que indicó un buen ajuste de datos.

TABLA 7. Datos de Absorbancia para patrones de ácido gálico.

Concentración (ppm)	A1	A2	A3	A4	$\bar{A}$ *	DS**
50	0,105	0,104	0,104	0,104	0,104	0,0005
100	0,149	0,149	0,15	0,15	0,150	0,0006
150	0,207	0,205	0,206	0,206	0,206	0,0008
250	0,305	0,305	0,303	0,305	0,305	0,0010
500	0,547	0,546	0,546	0,546	0,546	0,0005

$\bar{A}$  \* corresponde a la absorbancia promedio y DS\*\* es la desviación estándar para cuatro medidas de absorbancia

GRÁFICA 5. Curva de calibración para determinar el contenido de fenoles totales, fuente ésta investigación.



Con la ecuación de la recta se obtuvo el contenido de fenoles totales para los extractos crudos obtenidos por los tres métodos, los resultados obtenidos se indican en las siguientes tablas y se expresan como miligramos de ácido gálico por 100 gramos de fruta (mg ácido gálico/100g fruta).

En la siguiente tabla, se observa los resultados del método de Follin Cicolteau para las tres muestras de los extractos obtenidos mediante ES.

TABLA 8. Contenido de fenoles totales para ES.

REPLICA	MUESTRA 1		MUESTRA 2		MUESTRA 3	
	A	FT	A	FT	A	FT
1	0,391	335,8	0,382	326,8	0,389	333,8
2	0,392	336,8	0,381	325,8	0,390	334,8
3	0,392	336,8	0,383	327,8	0,390	335
$\bar{x}$	0,392	336,5	0,382	326,8	0,390	334,5
DS	0,0	0,6	0,0	1	0,0	0,6
CV	0,1	0,2	0,3	0,3	0,1	0,2

Donde A indica la absorbancia, CV el coeficiente de variación, FT el contenido de fenoles totales.

En las anteriores tablas se observa los resultados obtenidos para la determinación de fenoles totales para cada uno de los extractos crudos por ES.

De igual forma se obtuvo los siguientes resultados para los extractos obtenidos por el método de EAM.



TABLA 9. Contenido de fenoles totales para EAM.

REPLICA	MUESTRA 1		MUESTRA 2		MUESTRA 3	
	A	FT	A	FT	A	FT
1	0,317	261,8	0,325	269,8	0,315	259,8
2	0,318	262,8	0,323	267,8	0,313	257,8
3	0,317	261,8	0,323	267,8	0,312	256,8
$\bar{x}$	0,317	262,1	0,324	268,5	0,313	258,1
DS	0,0	0,6	0,0	1,2	0,0	1,5
CV	0,2	0,2	0,4	0,4	0,5	0,6

En las anteriores tablas se observa los resultados obtenidos para la determinación de fenoles totales para cada uno de los extractos obtenidos por EAM.

De igual forma se obtuvo los siguientes resultados para los extractos obtenidos por el método de EFA.

TABLA 10. Contenido de fenoles totales para EFA.

REPLICA	MUESTRA 1		MUESTRA 2		MUESTRA 3	
	A	FT	A	FT	A	FT
1	0,255	199,8	0,251	195,8	0,263	207,8
2	0,257	201,8	0,253	197,8	0,263	207,8
3	0,254	198,8	0,251	195,8	0,26	204,8
$\bar{x}$	0,255	200,1	0,252	196,5	0,262	206,8
DS	0,0	1,5	0,0	1,2	0,0	1,7
CV	0,6	0,8	0,5	0,6	0,7	0,8

En las anteriores tablas se observa los resultados obtenidos para la determinación de fenoles totales para cada uno de los extractos obtenidos por EFA.

#### 4.3.1.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS MEDIANTE LOS DIFERENTES PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN PARA EL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES:

Para realizar la comparación de los métodos de extracción, se realizaron tres réplicas por cada muestra. Por lo tanto, al tener tres muestras por cada técnica de extracción, y al realizar tres réplicas por cada muestra, se utilizó nueve datos por cada técnica de extracción y en conjunto, 27 datos totales al ser tres métodos aplicados.

Para la comparación de los métodos de extracción en cuanto a la cuantificación de fenoles totales, se obtuvo los siguientes resultados del diseño de experimentos, teniendo en cuenta que las unidades utilizadas fueron mg de ácido gálico/100g de fruto y que el método uno corresponde a la extracción con solventes, el método dos a la extracción asistida con microondas y el método 3 a la extracción por fermentación alcohólica.

##### 4.3.1.1.1 Identificación de Valores Atípicos – Contenido de Fenoles totales

TABLA 11. Estadísticos de centralidad y dispersión para el contenido de fenoles totales

Media muestral (mg de ácido gálico/100g de fruto)	265,6
Mediana muestral (mg de ácido gálico/100g de fruto)	261,8
Desviación estándar muestral (mg de ácido gálico/100g de fruto)	54,9
Coefficiente de variación	20,7%

La anterior tabla indica los resultados de la mediana y la media, donde se puede observar que los valores se encuentran cerca, por lo cual los datos son distribuidos de una manera asimétrica positiva con sesgo a la derecha, esto indica que hay mayor cantidad de valores más bajos de contenido de fenoles totales; que altos en la totalidad de los 27 datos. De igual forma también se evidencia que los datos se presentan de una manera homogénea debido que la desviación estándar es pequeña, además que existe una variabilidad de más o menos 20,7% respecto de la media.

De igual forma se encontró que la estimación de la media para la población está entre (243,8-287,3) mg de ácido gálico/100g de fenoles totales con una confianza del 95%.

##### 4.3.1.1.2 Prueba de Grubb para el contenido de fenoles totales

Estadístico de prueba = 1,3

Valor-P = 1,0

Como se puede observar, el valor-P para la prueba de Grubb es mayor que 0,05, por lo cual no representó un valor atípico significativo, por lo que se asume que todos los valores de fenoles totales siguen una distribución normal.

#### 4.3.1.1.3 Prueba de Dixon para el contenido de fenoles totales

TABLA 12. Identificación de valores atípicos para el contenido de fenoles totales con la prueba de Dixon.

Valores atípicos	Estadístico	Prueba al 5%	Prueba al 1%
2 por derecha	0,0070922	No sig.	No sig.
2 por izquierda	0,0141844	No sig.	No sig.

La prueba de Dixon, confirmó que en este caso no hay valores atípicos significativos para el contenido de fenoles totales.

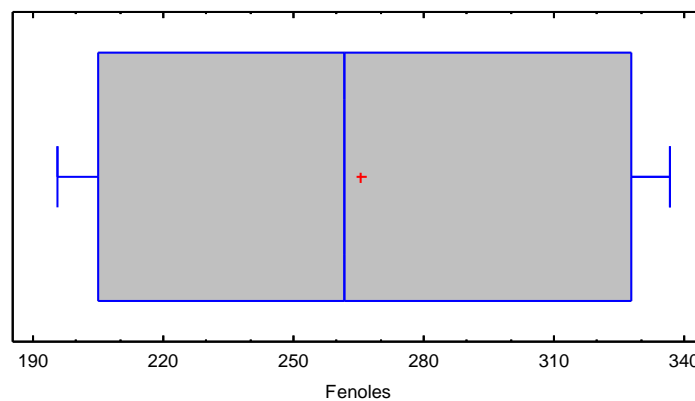
#### 4.3.1.1.4 Pruebas de Normalidad para el contenido de fenoles totales

TABLA 13. Pruebas de normalidad para el contenido de fenoles totales

Prueba	Estadístico	Valor-P
Chi-Cuadrado	65,8	7,6E-10
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,8	0
Valor-Z para asimetría	0,1	0,9

En la anterior tabla de pruebas de normalidad se observa que el valor-P más bajo de las pruebas realizadas es igual a 7,6E-10, cuyo valor es menor que 0,05, por lo cual se rechaza la idea de que la cantidad de fenoles totales proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

GRÁFICA 6. Caja y Bigotes para el contenido de fenoles totales, fuente ésta investigación.



En el gráfico de caja y bigotes se observa que la distribución de los datos es de manera asimétrica, pero no normales además que no hay valores atípicos.

#### 4.3.1.1.5 ANOVA Simple – Contenido de fenoles totales por método de extracción

Para realizar en este análisis se utilizó como variable dependiente el contenido de fenoles totales, y el factor fue el método de extracción.

TABLA 14. ANOVA para el contenido de fenoles totales por método de extracción

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	77869,6	2	38934,8	1834,5	0
Dentro de grupos	509,369	24	21,2237		
Total	78378,9	26			

La tabla ANOVA para el contenido de fenoles totales por método de extracción descompone la varianza de la cantidad de fenoles totales en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de grupos.

Se puede observar que la razón-F, que en este caso es igual a 1834,5, el cual es el cociente del estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de fenoles totales entre un método de extracción y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

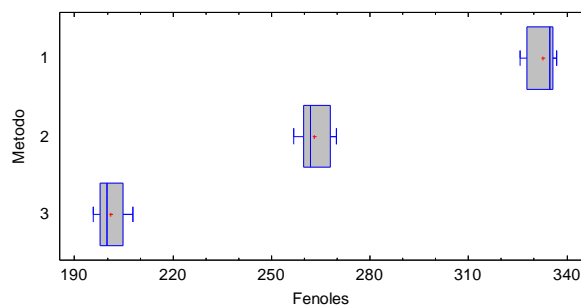
#### 4.3.1.1.6 Verificación de Varianza para el contenido de fenoles totales

TABLA 15. Prueba de Levene para verificación de varianza del contenido de fenoles totales

Factor	Prueba	Valor-P
Levene	0,04	0,96

En la tabla de verificación de varianza; el estadístico mostrado evalúa la hipótesis de que la desviación estándar del contenido de fenoles totales dentro de cada uno de los tres métodos de extracción es la misma. Puesto que el valor-P es mayor que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

GRÁFICA 7. Caja y Bigotes para el contenido de fenoles totales por cada método de extracción, fuente ésta investigación.



En el gráfico de caja y bigotes se observa la comparación de los tres métodos de extracción (método 1 ES, método 2; EAM y método 3; EFA), donde se evidencia que el método que arrojó mayores cantidades en la extracción de fenoles totales fue el método uno que corresponde a la extracción tradicional con solventes.

#### 4.3.1.1.7 Modelos Lineales Generalizados para el contenido de fenoles totales

TABLA 16. Suma de Cuadrados para el contenido de fenoles totales

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Método	77869,6	2	38934,8	14009,1	0
Muestra (Método)	16,6756	6	2,77926	0,1	0,9
Replica (Método Muestra)	492,693	18	27,4		
Total	78378,9	26			

Error medio absoluto = 0,0

Estadístico Durbin-Watson =

En los resultados obtenidos para el diseño de experimentos en cuanto a los modelos lineales generalizados, se observa que en la tabla de suma de cuadrados para el contenido de fenoles totales indica que valor-P más alto es 0,9, por lo que se concluyó que la relación de las tres muestras tomadas por cada método de extracción no es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95,0 %. En este caso se puede observar con el error medio absoluto y al no haber estadístico de Durbin-Watson, que no hay una correlación significativa entre la cantidad de fenoles totales por método de extracción.

TABLA 17. Medias de Mínimos Cuadrados para el contenido de fenoles totales con intervalos de confianza del 95,0 %

Nivel	Recuento	Media (mg de ácido gálico/100g de fruto)	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
MEDIA GENERAL	27	265,6			
Método					
1	9	332,6	0,6	331,2	333,9
2	9	262,9	0,6	261,6	264,3
3	9	201,1	0,6	199,8	202,5
Muestra dentro Método					
1 1	3	332,1	3,0	325,8	338,5
1 2	3	263,8	3,0	257,5	270,1
1 3	3	201,1	3,0	194,8	207,5
2 1	3	332,5	3,0	326,1	338,8
2 2	3	262,8	3,0	256,5	269,1
2 3	3	202,5	3,0	196,1	208,8
3 1	3	333,2	3,0	326,9	339,5
3 2	3	262,1	3,0	255,8	268,5
3 3	3	199,8	3,0	193,5	206,1

La anterior tabla muestra el contenido de fenoles totales medios para cada nivel de los factores. También muestra los errores estándar de cada media, que son una medida de su variabilidad de muestreo. Las dos columnas de la extrema derecha muestran intervalos de confianza del 95,0% para cada una de las medias, donde se obtuvo mayor contenido de fenoles totales en el método uno con una media de 332,6 mg de ácido gálico/100g de fruto. De igual forma se evidencia en las muestras dentro de cada método de extracción que la mayor media de contenido de fenoles totales, para todos los métodos estuvo con mayores cantidades en las tres muestras realizadas por el método uno, con 332,133 mg de ácido gálico/100g de fruto para la muestra 1, 332,5 mg de ácido gálico/100g para la muestra 2 y 333,2 mg de ácido gálico/100g para la extracción la muestra 3, del método de extracción con solventes (método 1).

TABLA 18. Comparaciones Múltiples para el contenido de fenoles totales por método de extracción

Método	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
3	9	201,1	0,6	X
2	9	262,9	0,6	X
1	9	332,6	0,6	X

En la anterior tabla de comparaciones múltiples se identificaron los tres métodos de extracción como grupos homogéneos, entre los cuales no hubo diferencias estadísticamente significativas. El método de extracción donde se obtuvo una mayor cantidad de fenoles totales con una media de 332,6 mg de ácido gálico/100 g de fruto fue el método de extracción con solventes (método 1).

TABLA 19. Diferencias significativas entre los métodos de extracción para el contenido de fenoles totales

Contraste	Significancia	Diferencia	Límites +/-
1 - 2	*	69,7	1,9
1 - 3	*	131,5	1,9
2 - 3	*	61,8	1,9

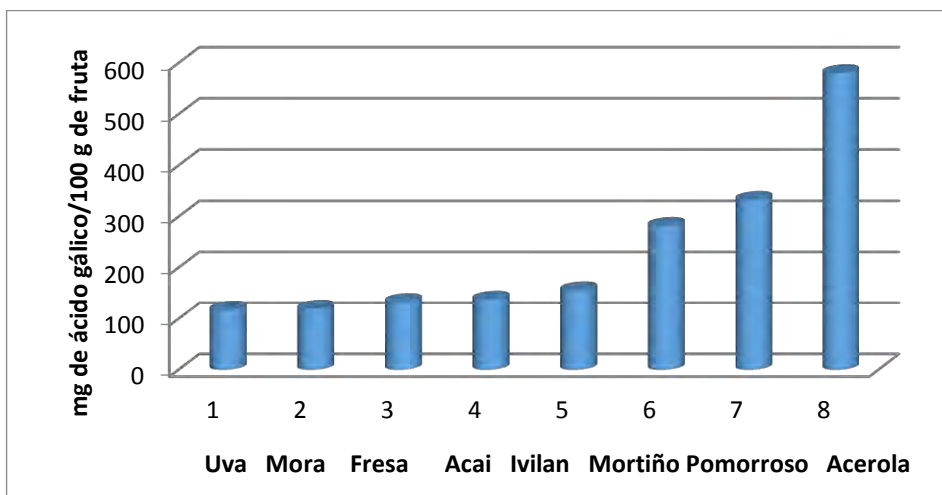
\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

La anterior tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras por método de extracción. Se evidencia las diferencias estimadas entre cada par de medias, donde cada relación de métodos de extracción que se observa en la tabla en la columna de contraste; exhiben una diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95,0%.

Los resultados anteriormente obtenidos indican que el método de extracción donde se obtuvo mejores resultados en cuanto al contenido de fenoles totales fue el método de extracción con solventes.

Tomando como referencia el contenido de fenoles totales que indicó una mejor tendencia en cuanto al método de extracción, se realizó una comparación con otros frutos reportados en la literatura, en los que las mediciones se hicieron con el mismo método de extracción y en las mismas condiciones (GRÁFICA 8).

GRÁFICA 8. Contenido de fenoles totales en diferentes frutos, fuente ésta investigación.



En la anterior gráfica se observa que el extracto crudo de pomorroso obtenido por la extracción con solventes contiene un elevado contenido de fenoles totales con un valor de 332,6 mg/100 g de fruta, el mayor contenido de fenoles totales se presenta en la fruta amazónica acerola con un contenido de 580,1 mg/100 g de fruta. Sin embargo, se encuentra superior que frutas como el acai, la fresa la mora, la uva<sup>67</sup>, ivilan<sup>68</sup> y mortiño<sup>69</sup>.

#### 4.3.2 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS:

Teniendo en cuenta que no se han realizado estudios de elucidación estructural de las antocianinas mayoritarias en el fruto de pomorroso, la cantidad de antocianinas monoméricas presentes en este fruto se expresaron como mg de cianidina-3-glicosido/100g de fruto.

En la siguiente tabla se muestran los datos de absorbancia tomada a la longitud de onda de máxima absorción a los pH 1 y 4.5, para el extracto crudo de ES, teniendo en cuenta que se realizó por triplicado el proceso para cada extracto.

<sup>67</sup> KUSKOSKI, E. Op. Cit.p., 5453

<sup>68</sup> CHARFUELAN, C. Op. Cit.p., 72

<sup>69</sup> JIMENEZ, J. Op. Cit.p., 80



TABLA 20. Datos a pH1 para ES

M	A ( $\lambda_{max}$ 518)	A ( $\lambda_{max}$ 518)	A ( $\lambda_{max}$ 518)	$\bar{A}$ ( $\lambda_{518}$ )	DS ( $\lambda_{518}$ )	CV ( $\lambda_{518}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	$\bar{A}$ ( $\lambda_{700}$ )	DS ( $\lambda_{700}$ )	CV ( $\lambda_{700}$ )
1	0,258	0,259	0,257	0,258	0,001	0,388	0,065	0,062	0,064	0,064	0,002	2,399
2	0,261	0,263	0,263	0,262	0,001	0,440	0,059	0,059	0,06	0,059	0,001	0,973
3	0,257	0,255	0,255	0,256	0,001	0,452	0,060	0,062	0,061	0,061	0,001	1,639

TABLA 21. Datos a pH 4.5 para ES

M	A ( $\lambda_{max}$ 518)	A ( $\lambda_{max}$ 518)	A ( $\lambda_{max}$ 518)	$\bar{A}$ ( $\lambda_{518}$ )	DS ( $\lambda_{518}$ )	CV ( $\lambda_{518}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	$\bar{A}$ ( $\lambda_{700}$ )	DS ( $\lambda_{700}$ )	CV ( $\lambda_{700}$ )
1	0,165	0,162	0,166	0,164	0,002	1,267	0,07	0,068	0,069	0,069	0,001	1,449
2	0,166	0,168	0,167	0,167	0,001	0,599	0,069	0,069	0,067	0,068	0,001	1,690
3	0,161	0,159	0,16	0,16	0,001	0,625	0,065	0,067	0,066	0,066	0,001	1,515

En la siguiente tabla se muestran los datos de absorbancia tomada a la longitud de onda de máxima absorción a los pH 1 y 4.5, para el extracto crudo de EAM, teniendo en cuenta que se realizó por triplicado el proceso para cada extracto.

TABLA 22. Datos a pH1 para EAM

M	A ( $\lambda_{max}$ 512)	A ( $\lambda_{max}$ 512)	A ( $\lambda_{max}$ 512)	$\bar{A}$ ( $\lambda_{512}$ )	DS ( $\lambda_{512}$ )	CV ( $\lambda_{512}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	$\bar{A}$ ( $\lambda_{700}$ )	DS ( $\lambda_{700}$ )	CV ( $\lambda_{700}$ )
1	0,226	0,223	0,225	0,225	0,002	0,680	0,072	0,07	0,072	0,071	0,001	1,619
2	0,224	0,225	0,224	0,224	0,001	0,257	0,069	0,07	0,072	0,070	0,002	2,172
3	0,225	0,223	0,224	0,224	0,001	0,446	0,072	0,073	0,073	0,073	0,001	0,795

TABLA 23. Datos a pH 4.5 para EAM

M	A ( $\lambda_{max}$ 512)	A ( $\lambda_{max}$ 512)	A ( $\lambda_{max}$ 512)	$\bar{A}$ ( $\lambda_{512}$ )	DS ( $\lambda_{512}$ )	CV ( $\lambda_{512}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	$\bar{A}$ ( $\lambda_{700}$ )	DS ( $\lambda_{700}$ )	CV ( $\lambda_{700}$ )
1	0,18	0,078	0,179	0,146	0,059	40,231	0,065	0,067	0,066	0,066	0,001	1,515
2	0,181	0,179	0,179	0,180	0,001	0,643	0,066	0,066	0,064	0,065	0,001	1,767
3	0,178	0,18	0,178	0,179	0,001	0,646	0,067	0,068	0,067	0,067	0,001	0,857

En la siguiente tabla se muestran los datos de absorbancia tomada a la longitud de onda de máxima absorción a los pH 1 y 4.5, para el extracto crudo de EFA, teniendo en cuenta que se realizó por triplicado el proceso para cada extracto.

TABLA 24. Datos a pH1 para EFA

M	A (λmax 519)	A (λmax 519)	A (λmax 519)	$\bar{A}$ (λ519)	DS (λ519)	CV (λ519)	A (λ700)	A (λ700)	A (λ 700)	$\bar{A}$ (λ700)	DS (λ700)	CV (λ700)
1	0,241	0,241	0,242	0,241	0,001	0,239	0,021	0,022	0,02	0,021	0,001	4,762
2	0,24	0,242	0,24	0,241	0,001	0,480	0,02	0,022	0,022	0,021	0,001	5,413
3	0,239	0,241	0,241	0,240	0,001	0,480	0,022	0,021	0,021	0,021	0,001	2,706

TABLA 25. Datos a pH 4.5 para EFA

M	A (λmax 519)	A (λmax 519)	A (λmax 519)	$\bar{A}$ (λ519)	DS (λ519)	CV (λ519)	A (λ700)	A (λ700)	A (λ 700)	$\bar{A}$ (λ700)	DS (λ700)	CV (λ700)
1	0,127	0,126	0,126	0,126	0,001	0,457	0,025	0,027	0,026	0,026	0,001	3,846
2	0,126	0,128	0,128	0,127	0,001	0,907	0,024	0,024	0,025	0,024	0,001	2,373
3	0,127	0,126	0,127	0,127	0,001	0,456	0,027	0,027	0,026	0,027	0,001	2,165

Para la determinación de antocianinas monoméricas, se aplicó las ecuaciones que se describió en el apartado 2.2.5.

TABLA 26. Contenido de antocianinas monoméricas en ES, EAM y EFA.

Antocianinas Monoméricas (mg de Cy-3-glu/100 g de fruto)									
ES			EAM			EFA			
Muestra	Réplica			Réplica			Réplica		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	58.6	60.6	57.9	26.3	28.3	26.9	79.5	80.8	82.1
2	56.6	56.6	55.2	26.9	28.3	24.9	79.5	78.1	77.4
3	57.9	61.3	59.3	28.3	25.6	26.9	78.8	81.5	80.1

#### 4.3.2.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS MEDIANTE LOS DIFERENTES PROCEDIMIENTOS DEL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS:

Al igual que la comparación de cada método de extracción del contenido de fenoles totales, se realizó tres replicas por cada muestra. Por lo tanto, también se contó con 27 datos totales, donde se obtuvo los siguientes resultados del diseño de experimentos, teniendo en cuenta que las unidades utilizadas fueron mg de cy-3-glu/100g de fruto.

#### 4.3.2.1.1 Identificación de Valores Atípicos – Antocianinas monoméricas

TABLA 27. Estadísticos de centralidad y dispersión para el contenido de antocianinas monoméricas.

Media muestral (mg de cy-3-glu/100g de fruto)	54,9
Mediana muestral (mg de cy-3-glu/100g de fruto)	57,9
Desviación estándar muestral (mg de cy-3-glu/100g de fruto)	22,2
Coeficiente de variación	38,3%

La tabla de centralidad indica los resultados de la mediana y la media, donde se puede observar que los valores se encuentran cerca, por lo cual los datos son distribuidos de una manera asimétrica negativa con sesgo a la izquierda, esto indica que hay mayor cantidad de valores más altos de contenido de antocianinas monoméricas que bajos en la totalidad de los 27 datos. De igual forma, se evidencia que los datos se presentan de una manera homogénea, pero con una variabilidad de más o menos 38,3% respecto de la media.

Se encontró que la estimación de la media para la población del contenido de antocianinas monoméricas en el fruto de pomorroso se encuentra entre (46,2–54,9) mg cy-3-glu/100g de fruto con una confianza del 95%.

#### 4.3.2.1.2 Prueba de Grubbs para el contenido de antocianinas monoméricas

Estadístico de prueba = 1,4

Valor-P = 1,0

En este caso, el valor-P para la prueba de Grubb es mayor que 0,05, por lo que no representó un valor atípico significativo, por lo que se asume que todos los valores de contenido de antocianinas monoméricas en el fruto de pomorroso siguen una distribución normal.

#### 4.3.2.1.3 Prueba de Dixon para el contenido de antocianinas monoméricas

TABLA 28. Identificación de valores atípicos para el contenido de antocianinas monoméricas con la prueba de Dixon.

Valores atípicos	Estadístico	Prueba al 5%	Prueba al 1%
1 por derecha	0,0106195	No sig.	No sig.
1 por izquierda	0,0123675	No sig.	No sig.
2 por derecha	0,0230088	No sig.	No sig.
2 por izquierda	0,024735	No sig.	No sig.

1 en cada lado	0,0122378	No sig.	No sig.
----------------	-----------	---------	---------

La prueba de Dixon confirmó que en este caso no hay valores atípicos significativos para el contenido de antocianinas monoméricas en el fruto de pomorroso.

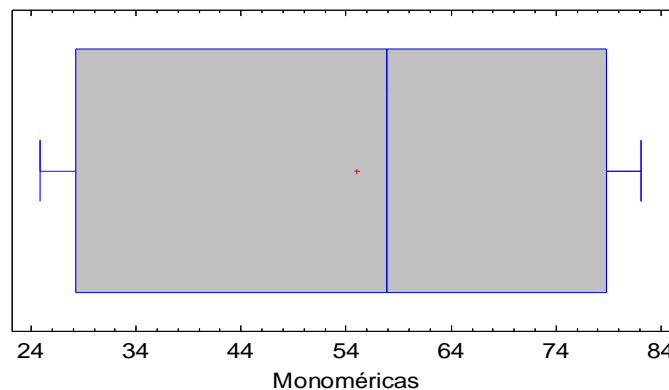
#### 4.3.2.1.4 Pruebas de Normalidad para el contenido de antocianinas monoméricas

TABLA 29. Pruebas de normalidad para el contenido de antocianinas monoméricas

Prueba	Estadístico	Valor-P
Chi-Cuadrado	65,8	7,6E-10
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,8	0
Valor-Z para asimetría	0,4	0,7

En la tabla se indican diversas pruebas realizadas para determinar si el contenido de antocianinas monoméricas en el fruto de pomorroso puede modelarse adecuadamente con una distribución normal. Se observa que el valor-P más bajo de las pruebas realizadas es igual a 7,6E-10 en la prueba chi-cuadrado. Debido a que el valor-P para ésta es menor que 0,05, se rechaza la idea de que la cantidad de antocianinas monoméricas en el fruto de pomorroso, proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

GRÁFICA 9. Caja y Bigotes para el contenido de antocianinas monoméricas, fuente ésta investigación.



En el gráfico de caja y bigotes se observa que la distribución de los datos es de manera asimétrica, no normales además que no hay valores atípicos.

#### 4.3.2.1.5 ANOVA Simple - Contenido de Antocianinas Monoméricas por Método de extracción

En este caso se utilizó como variable dependiente el contenido de antocianinas monoméricas y como factor el método de extracción.

TABLA 30. ANOVA para el contenido de antocianinas monoméricas por método de extracción

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12698,6	2	6349,3	2456,3	0
Dentro de grupos	62,0378	24	2,58491		
Total	12760,6	26			

La tabla anterior tabla indica la descomposición de la varianza de antocianinas monoméricas en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de grupos. La razón-F es igual a 2456,3 y tiene un valor-P menor que 0,05, por lo cual se asume que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del contenido de antocianinas monoméricas del fruto de pomorroso entre un método de extracción y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

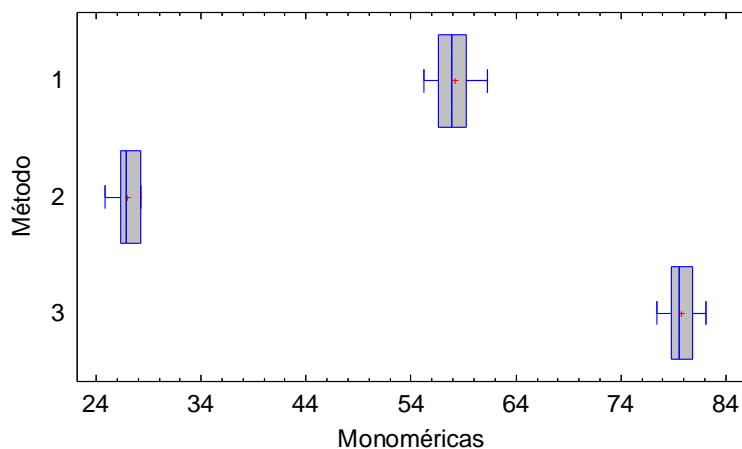
#### 4.3.2.1.6 Verificación de Varianza para el contenido de antocianinas monoméricas

TABLA 31. Prueba de Levene para verificación de varianza del contenido de antocianinas monoméricas

Factor	Prueba	Valor-P
Levene	0,834398	0,446343

La anterior tabla indica el análisis de verificación de varianza, donde el estadístico mostrado evalúa la hipótesis de que la desviación estándar del contenido de antocianinas monoméricas en el fruto de pomorroso dentro de cada uno de los tres de métodos de extracción, es la misma. En este caso, el valor-P es mayor que 0,05, por lo cual no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

GRÁFICA 10. Caja y Bigotes para el contenido de antocianinas monoméricas por cada método de extracción, fuente ésta investigación.



En el grafico de caja y bigotes se observa la comparación de los tres métodos de extracción (método 1; ES, método 2; EAM, método 3; EFA), donde se evidencia que el método que arrojó mayores cantidades en la extracción de antocianinas monoméricas en el fruto de pomoroso fue el método tres que corresponde a la extracción con fermentación alcohólica.

#### 4.3.2.1.7 Modelos Lineales Generalizados para antocianinas monoméricas

TABLA 32. Suma de Cuadrados para el contenido de antocianinas monoméricas

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Método	12698,6	2	6349,3	1267,4	0
Muestra (Método)	30,1	6	5,0	2,8	0,0409
Replica (Método Muestra)	31,9	18	1,8		
Total	12760,6	26			

Error medio absoluto = 0,0

Estadístico Durbin-Watson =

En los resultados obtenidos para el diseño de experimentos en cuanto a los modelos lineales generalizados, se observa que en la tabla de suma de cuadrados para el

contenido de fenoles totales indica que valor-P más alto es 0,0409, por lo que se concluyó que la relación de las tres muestras tomadas por cada método de extracción sí es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95,0 %. En este caso se puede observar con el error medio absoluto y al no haber estadístico de Durbin-Watson, que no hay una correlación significativa entre la cantidad de antocianinas monoméricas por método de extracción.

TABLA 43. Medias de Mínimos Cuadrados para el contenido de Antocianinas Monoméricas con intervalos de confianza del 95,0 %

Nivel		Recuento	Media	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
MEDIA GENERAL		27	54,9			
Método						
1		9	58,2	0,7	56,4	60,0
2		9	26,9	0,7	25,1	28,8
3		9	79,8	0,7	77,9	81,6
Muestra dentro Método						
1	1	3	59,0	0,8	57,4	60,7
1	2	3	27,2	0,8	25,5	28,8
1	3	3	80,8	0,8	79,2	82,4
2	1	3	56,1	0,8	54,5	57,8
2	2	3	26,7	0,8	25,0	28,3
2	3	3	78,3	0,8	76,7	79,9
3	1	3	59,5	0,8	57,9	61,1
3	2	3	26,9	0,8	25,3	28,6
3	3	3	80,1	0,8	78,5	81,8

La tabla de medias de mínimos cuadrados para el contenido de antocianinas monoméricas muestra los errores estándar de cada media, que son una medida de la variabilidad de muestreo. Las dos columnas de la extrema derecha muestran intervalos de confianza del 95,0% para cada una de las medias, donde se obtuvo mayor contenido de antocianinas monoméricas en el método tres con una media de 79,8 mg cy-3-glu/100g de fruto. De igual forma se evidencia en las muestras dentro de cada método de extracción la

mayor media de contenido de antocianinas monoméricas, para todos los métodos estuvo con mayores cantidades en las tres muestras realizadas por el método tres, con 80,8 mg cy-3-glu/100g de fruto para la muestra 1, 78,3 mg cy-3-glu/100g de fruto muestra 2 y 80,1 mg cy-3-glu/100g de fruto para la muestra 3. Lo anterior indicó el método de extracción donde se obtuvieron mejores resultados para el contenido de antocianinas monoméricas en el fruto de pomorroso fue el método tres, que corresponde a la extracción por fermentación alcohólica.

TABLA 34. Comparaciones Múltiples para el contenido de antocianinas monoméricas por método de extracción

Método	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
2	9	26,9	0,7	X
1	9	58,2	0,7	X
3	9	79,8	0,7	X

En la tabla de comparaciones múltiples se identificaron los tres métodos de extracción como grupos homogéneos, sin diferencias estadísticamente significativas. El método de extracción donde se obtuvo una mayor cantidad antocianinas monoméricas con una media de 79,8 mg cy-3-glu/100g de fruto fue el método de extracción con fermentación alcohólica (método 3).

TABLA 35. Diferencias significativas entre los métodos de extracción para el contenido de antocianinas monoméricas

Contraste	Significancia	Diferencia	Límites +/-
1 - 2	*	31,3	3,4
1 - 3	*	-21,5	3,4
2 - 3	*	-52,8	3,4

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

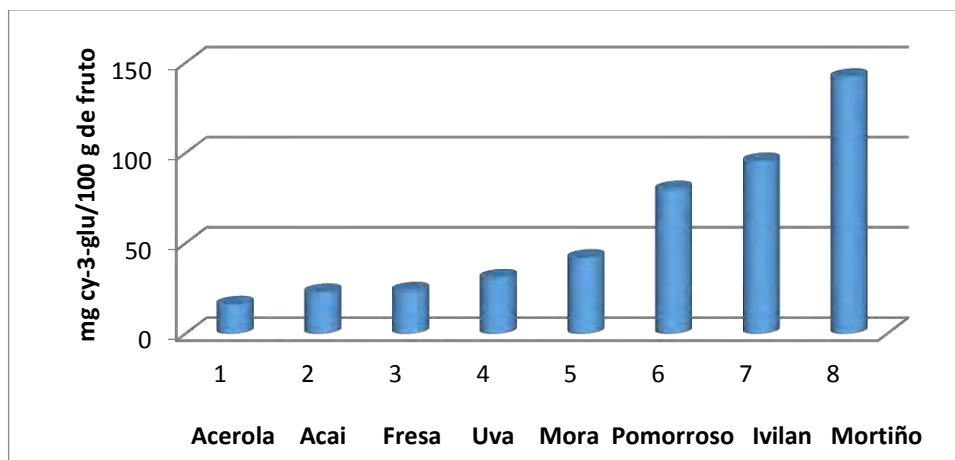
En la anterior tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras por método de extracción. Se evidencia las diferencias estimadas entre cada par de medias, donde cada relación de métodos de extracción que se observa en la tabla en la columna de contraste; exhiben una diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95,0%.

Los resultados anteriormente obtenidos indican que el método de extracción donde se obtuvo mejores resultados en cuanto al contenido de antocianinas monoméricas fue el método de extracción por fermentación alcohólica.



Tomando como referencia el contenido de antocianinas monoméricas que indicó una mejor tendencia en cuanto al método de extracción, se realizó una comparación con otros frutos reportados en la literatura, en los que las mediciones se hicieron con el mismo método de extracción y en las mismas condiciones.

GRÁFICA 11. Contenido de antocianinas monoméricas en diferentes frutos, fuente ésta investigación.



Como se observa en el anterior gráfico, el contenido de antocianinas monoméricas presentes en el fruto de pomorroso se encuentra dentro de los más grandes, superior a frutos como la mora, uva, fresa, acai, o la acerola<sup>70</sup>, pero por debajo de frutos como el ivilan<sup>71</sup> y el mortiño<sup>72</sup>.

#### 4.3.3 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS POLIMÉRICAS

Los resultados que se indican en la siguiente tabla corresponden a medidas de absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción ( $\lambda$  max), 420 nm y 700 nm.

TABLA 36. Datos tomados en agua para ES

M	A ( $\lambda$ max 518)	A ( $\lambda$ max 518)	A ( $\lambda$ max 518)	$\bar{A}$ ( $\lambda$ 518)	DS ( $\lambda$ 518)	CV ( $\lambda$ 518)	A ( $\lambda$ 700)	A ( $\lambda$ 700)	A ( $\lambda$ 700)	$\bar{A}$ ( $\lambda$ 700)	DS ( $\lambda$ 700)	CV ( $\lambda$ 700)
1	0,425	0,425	0,427	0,426	0,001	0,271	0,003	0,003	0,003	0,0031	0,0001	3,685
2	0,422	0,424	0,423	0,423	0,001	0,236	0,003	0,003	0,003	0,0029	0,0001	3,448
3	0,426	0,427	0,427	0,427	0,001	0,135	0,003	0,003	0,003	0,0031	0,0001	1,883

TABLA 37. Datos tomados en metabisulfito de sodio para ES

M	A ( $\lambda$ max 518)	A ( $\lambda$ max 518)	A ( $\lambda$ max 518)	$\bar{A}$ ( $\lambda$ 518)	DS ( $\lambda$ 518)	CV ( $\lambda$ 518)	A ( $\lambda$ 700)	A ( $\lambda$ 700)	A ( $\lambda$ 700)	$\bar{A}$ ( $\lambda$ 700)	DS ( $\lambda$ 700)	CV ( $\lambda$ 700)
1	0,071	0,072	0,071	0,071	0,0002	0,292	0,025	0,023	0,024	0,024	0,001	4,167
2	0,070	0,07	0,07	0,070	0,0001	0,083	0,023	0,023	0,025	0,024	0,001	4,879

3	0,071	0,071	0,071	0,071	0,0001	0,081	0,025	0,024	0,024	0,024	0,001	2,373
---	-------	-------	-------	-------	--------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

<sup>70</sup> KUSKOSKI, E. Op. Cit.p., 5453

<sup>71</sup> CHARFUELAN, C. Op. Cit.p., 62

<sup>72</sup> JIMENEZ, J. Op. Cit.p., 68

Las siguientes tablas indican los datos para la longitud de onda a 420 nm:

TABLA 38. Datos tomados en agua para ES a 420 nm

M	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	$\bar{A}$ ( $\lambda_{420}$ )	DS	CV
1	0,768	0,768	0,77	0,769	0,001	0,150
2	0,718	0,718	0,719	0,718	0,001	0,080
3	0,719	0,72	0,72	0,720	0,001	0,080

TABLA 39. Datos tomados en metabisulfito de sodio para ES a 420 nm

M	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	$\bar{A}$ ( $\lambda_{420}$ )	DS	CV
1	0,611	0,611	0,612	0,611	0,001	0,094
2	0,613	0,612	0,612	0,612	0,001	0,094
3	0,613	0,613	0,614	0,613	0,001	0,094

De igual forma se realizó el estudio para la EAM:

TABLA 40. Datos tomados en agua para EAM

M	A ( $\lambda_{\max}$ 512)	A ( $\lambda_{\max}$ 512)	A ( $\lambda_{\max}$ 512)	$\bar{A}$ ( $\lambda_{512}$ )	DS ( $\lambda_{512}$ )	CV ( $\lambda_{512}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	$\bar{A}$ ( $\lambda_{700}$ )	DS ( $\lambda_{700}$ )	CV ( $\lambda_{700}$ )
1	0,403	0,402	0,402	0,402	0,001	0,144	0,004	0,004	0,004	0,004	5,77E-05	1,506
2	0,401	0,401	0,4	0,401	0,001	0,144	0,004	0,004	0,004	0,004	0	0
3	0,4	0,399	0,4	0,400	0,001	0,144	0,004	0,004	0,004	0,004	0,0001	2,778

TABLA 41. Datos tomados en metabisulfito de sodio para EAM

M	A ( $\lambda_{\max}$ 512)	A ( $\lambda_{\max}$ 512)	A ( $\lambda_{\max}$ 512)	$\bar{A}$ ( $\lambda_{512}$ )	DS ( $\lambda_{512}$ )	CV ( $\lambda_{512}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	$\bar{A}$ ( $\lambda_{700}$ )	DS ( $\lambda_{700}$ )	CV ( $\lambda_{700}$ )
1	0,051	0,051	0,051	0,051	5,77E-05	0,113	0,027	0,027	0,027	0,027	0	0
2	0,051	0,051	0,051	0,051	5,77E-05	0,113	0,028	0,027	0,028	0,028	0,001	2,087
3	0,05	0,05	0,049	0,050	0,001	1,162	0,028	0,027	0,026	0,027	0,001	3,704

Las siguientes tablas indican los datos para la longitud de onda de 420 nm:

TABLA 42. Datos tomados en agua para EAM a 420 nm

M	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	$\bar{A}$ ( $\lambda_{420}$ )	DS	CV
1	0,526	0,528	0,527	0,527	0,001	0,190
2	0,527	0,527	0,528	0,527	0,001	0,109
3	0,526	0,526	0,527	0,526	0,001	0,110

TABLA 43. Datos tomados en metabisulfito de sodio para EAM a 420 nm

M	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	$\bar{A}$ ( $\lambda_{420}$ )	DS	CV
1	0,499	0,5	0,5	0,500	0,001	0,116
2	0,498	0,498	0,497	0,498	0,001	0,116
3	0,498	0,497	0,497	0,497	0,001	0,116

De igual forma se realizó el estudio para la EFA:

TABLA 44. Datos tomados en agua para EFA

M	A ( $\lambda_{\max}$ 519)	A ( $\lambda_{\max}$ 519)	A ( $\lambda_{\max}$ 519)	$\bar{A}$ ( $\lambda_{519}$ )	DS ( $\lambda_{519}$ )	CV ( $\lambda_{519}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	$\bar{A}$ ( $\lambda_{700}$ )	DS ( $\lambda_{700}$ )	CV ( $\lambda_{700}$ )
1	0,41	0,412	0,411	0,411	0,001	0,243	0,002	0,002	0,002	0,002	5,77E-05	3,093
2	0,411	0,411	0,412	0,411	0,001	0,140	0,002	0,002	0,002	0,002	0	6,298
3	0,411	0,41	0,41	0,410	0,001	0,141	0,002	0,002	0,002	0,002	0	0

TABLA 45. Datos tomados en metabisulfito de sodio para EFA

M	A ( $\lambda_{\max}$ 519)	A ( $\lambda_{\max}$ 519)	A ( $\lambda_{\max}$ 519)	$\bar{A}$ ( $\lambda_{519}$ )	DS ( $\lambda_{519}$ )	CV ( $\lambda_{519}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	A ( $\lambda_{700}$ )	$\bar{A}$ ( $\lambda_{700}$ )	DS ( $\lambda_{700}$ )	CV ( $\lambda_{700}$ )
1	0,065	0,066	0,066	0,066	0,001	0,879	0,015	0,014	0,016	0,015	0,001	6,667
2	0,066	0,065	0,065	0,065	0,001	0,884	0,016	0,016	0,017	0,016	0,001	3,535
3	0,066	0,066	0,067	0,066	0,001	0,870	0,016	0,015	0,015	0,015	0,001	3,765

Las siguientes tablas indican los datos para la longitud de onda de 420 nm:

TABLA 46. Datos tomados en agua para EFA a 420 nm

M	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	$\bar{A}$ ( $\lambda_{420}$ )	DS	CV
1	0,65	0,652	0,652	0,651	0,001	0,177
2	0,652	0,653	0,652	0,652	0,001	0,089
3	0,653	0,653	0,654	0,653	0,001	0,088

TABLA 47. Datos tomados en metabisulfito de sodio para EFA a 420 nm

M	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	A ( $\lambda_{\max}$ 420)	$\bar{A}$ ( $\lambda_{420}$ )	DS	CV
1	0,512	0,513	0,512	0,512	0,001	0,113
2	0,513	0,513	0,514	0,513	0,001	0,112
3	0,514	0,515	0,514	0,514	0,001	0,112

Los resultados obtenidos para antocianinas poliméricas, donde se utilizó las ecuaciones del apartado 2.2.5 se indican en las siguientes tablas:

TABLA 48. Datos para la densidad de color para ES, EAM y EFA

DENSIDAD DEL COLOR									
ES			EAM			EFA			
Muestra	Réplica			Réplica			Réplica		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	11,9	11,9	11,9	9,2	9,2	9,2	10,6	10,6	10,6
2	11,3	11,4	11,4	9,2	9,2	9,2	10,6	10,6	10,6
3	11,4	11,4	11,4	9,2	9,2	9,2	10,6	10,6	10,6

TABLA 49. Datos para el color polimérico para ES, EAM y EFA

COLOR POLIMÉRICO									
ES			EAM			EFA			
Muestra	Réplica			Réplica			Réplica		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	1,6	1,6	1,6	1,2	1,2	1,2	1,4	1,4	1,4
2	1,6	1,6	1,6	1,2	1,2	1,2	1,4	1,4	1,4
3	1,6	1,6	1,6	1,2	1,2	1,2	1,4	1,4	1,4

TABLA 50. Datos para el porcentaje color polimérico para ES, EAM y EFA

COLOR POLIMÉRICO									
ES			EAM			EFA			
Muestra	Réplica			Réplica			Réplica		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	13,3	13,4	13,3	13,5	13,5	13,5	12,9	13,0	12,9

2	14,0	14,0	13,9	13,4	13,4	13,4	12,9	12,9	12,8
3	13,9	13,9	14,0	13,4	13,4	13,4	12,9	13,0	13,0

#### 4.3.3.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS MEDIANTE LOS DIFERENTES PROCEDIMIENTOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS POLIMÉRICAS:

##### 4.3.3.1.1 Identificación de Valores Atípicos – Color polimérico

TABLA 51. Estadísticos de centralidad y dispersión para el color polimérico.

Media muestral	1,2
Mediana muestral	1,2
Desviación estándar muestral	0,006
Coefficiente de variación	0,47%

La tabla de centralidad indica que los valores entre la media y la mediana son muy similares, por lo cual los datos son distribuidos de una manera asimétrica positiva con sesgo a la derecha. Hay mayor cantidad de valores más bajos de fenoles totales que altos en la totalidad de los 27 datos. De igual forma se evidencia que los datos se presentan de una manera homogénea, pero con una variabilidad de más o menos 0,47% respecto de la media.

##### 4.3.3.1.2 Prueba de Grubbs para el color polimérico

Estadístico de prueba = 1,7

Valor-P = 1,0

El valor-P para la prueba de Grubb es mayor que 0,05, por lo que no representó un valor atípico significativo, por tanto, se asume que todos los datos de color polimérico siguen una distribución normal.

##### 4.3.3.1.3 Prueba de Dixon para el color polimérico

TABLA 52. Identificación de valores atípicos para el color polimérico con la prueba de Dixon.

Valores atípicos	Estadístico	Prueba al 5%	Prueba al 1%
2 por izquierda	0,0588235	No sig.	No sig.

La prueba de Dixon confirmó que en este caso no hay valores atípicos significativos para el color polimérico en el fruto de pomorroso como se puede observar en la anterior tabla.

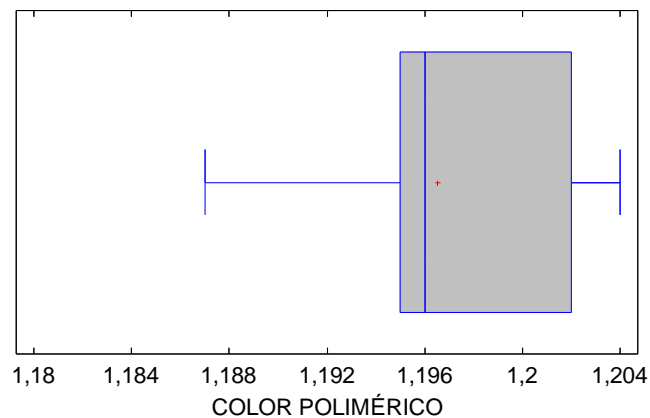
#### 4.3.3.1.4 Pruebas de Normalidad para el color polimérico

TABLA 53. Pruebas de normalidad para el color polimérico

Prueba	Estadístico	Valor-P
Chi-Cuadrado	32,6	0,0006
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,9	0,007
Valor-Z para asimetría	0,5	0,633

Se observa que el valor-P más bajo de las pruebas realizadas es igual a 0,0006 en la prueba chi-cuadrado. Debido a que el valor-P para esta es menor que 0,05, se rechaza la idea de que el color polimérico, proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

GRÁFICA 12. Caja y Bigotes para el color polimérico, fuente ésta investigación.



En el gráfico de caja y bigotes se observa que la distribución de los datos es de manera asimétrica, no normales además que no hay valores atípicos.

#### 4.3.3.1.5 ANOVA Simple - Color polimérico por método de extracción

En este caso se utilizó como variable dependiente el color polimérico y como factor el método de extracción.

TABLA 54. ANOVA para el color polimérico por método de extracción

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,000669852	2	0,000334926	48,8	0,0000
Intra grupos	0,000164889	24	0,000006870 37		
Total	0,000834741	26			

La tabla anterior tabla indica la descomposición de la varianza de color polimérico en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos.

En este caso, la razón-F, que es igual a 48,8, tiene un valor-P menor que 0,05, por lo cual se asume que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del color polimérico del fruto de pomorroso entre un método de extracción y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

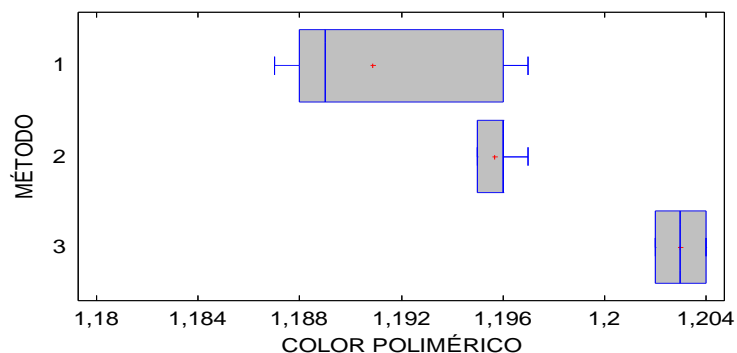
#### 4.3.3.1.6 Verificación de Varianza para el color polimérico

TABLA 55. Prueba de Levene para verificación de varianza para el color polimérico

Factor	Prueba	Valor-P
Levene	5,02727	0,0150118

La anterior tabla indica el análisis de verificación de varianza, donde el estadístico mostrado en evalúa la hipótesis de que la desviación estándar del color polimérico en el fruto de pomorroso dentro de cada uno de los tres de métodos de extracción, es la misma. En este caso, el valor-P es menor que 0,05, por lo cual existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95,0% de confianza.

GRÁFICA 13. Caja y Bigotes para el color polimérico por método de extracción, fuente ésta investigación.



En el grafico de caja y bigotes se observa la comparación de los tres métodos de extracción, (método 1; ES, método 2; EAM, método 3; EFA) donde se evidencia que el método que arrojó mejores resultados en cuanto al color polimérico en el fruto de pomorroso fue el método tres que corresponde a la extracción con fermentación alcohólica.

#### 4.3.3.1.7 Modelos Lineales Generalizados para el color polimérico

TABLA 56. Suma de Cuadrados para el color polimérico

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
MÉTODO	0,000669852	2	0,000334926	695,6	0,0000
RÉPLICA (MÉTODO)	0,00000288889	6	4,81481E-7	0,05	0,9992
MUESTRA (MÉTODO RÉPLICA)	0,000162	18	0,000009		
Total (corregido)	0,000834741	26			

Error medio absoluto = 0,0

Estadístico Durbin-Watson =

En los resultados obtenidos para el diseño de experimentos en cuanto a los modelos lineales generalizados, se observó que el valor-P más alto es de 0,9992, que indica que la relación entre el método de extracción y la muestra no presenta estadísticas significativas con un nivel de confianza del 95,0%. Al no haber estadístico de Durbin-Watson, indica que no hay una correlación significativa entre el color polimérico entre los tres métodos de extracción evaluados.



TABLA 57. Medias de Mínimos Cuadrados para el color polimérico con intervalos de confianza del 95,0 %

Nivel	Recuento	Media	Error Estándar	Límite Inferior	Límite Superior
MEDIA GENERAL	27	1,2			
Método					
1	9	1,19089	0,000231296	1,19032	1,19145
2	9	1,19567	0,000231296	1,1951	1,19623
3	9	1,203	0,000231296	1,20243	1,20357
Muestra dentro Método					
1 1	3	1,191	0,00173205	1,18736	1,19464
1 2	3	1,19567	0,00173205	1,19203	1,19931
1 3	3	1,203	0,00173205	1,19936	1,20664
2 1	3	1,19033	0,00173205	1,18669	1,19397
2 2	3	1,19533	0,00173205	1,19169	1,19897
2 3	3	1,20267	0,00173205	1,19903	1,20631
3 1	3	1,19133	0,00173205	1,18769	1,19497
3 2	3	1,196	0,00173205	1,19236	1,19964
3 3	3	1,20333	0,00173205	1,19969	1,20697

La tabla de medias de mínimos cuadrados para el color polimérico muestra los errores estándar de cada media, que son una medida de la variabilidad de muestreo. Las dos columnas de la extrema derecha muestran intervalos de confianza del 95,0% para cada una de las medias, donde se obtuvo mayor contenido de color polimérico en el método tres con una media de 1,20. De igual forma se evidencia en las muestras dentro de cada método de extracción la mayor media de color polimérico, para todos los métodos de extracción estuvo con mayores cantidades en las tres muestras realizadas por el método tres, con 1,203 para la muestra 1, 1,20267 muestra 2 y 1,20333 para la muestra 3. Lo anterior indicó el método de extracción donde se obtuvieron mejores resultados para el color polimérico en el fruto de pomorroso fue el método tres, que corresponde a la extracción por fermentación alcohólica.

TABLA 58. Comparaciones Múltiples para el color polimérico por método de extracción

Método	Recuento	Media MC	Sigma MC	Grupos Homogéneos
1	9	1,19089	0,000231296	X
2	9	1,19567	0,000231296	X
3	9	1,203	0,000231296	X

En la tabla de comparaciones múltiples se identificaron los tres métodos de extracción como grupos homogéneos, sin diferencias estadísticamente significativas. El método de extracción donde se obtuvo una mayor cantidad color polimérico con una media de 1,203 fue el método de extracción con fermentación alcohólica (método 3).

TABLA 59. Diferencias significativas entre los métodos de extracción para el color polimérico

Contraste	Significancia	Diferencia	Límites +/-
1 – 2	*	-0,0048	0,0008
1 – 3	*	-0,0121	0,0008
2 – 3	*	-0,0073	0,0008

\* denota una diferencia estadísticamente significativa.

En la anterior tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras por método de extracción. Se evidencia las diferencias estimadas entre cada par de medias, donde cada relación de métodos de extracción que se observa en la tabla en la columna de contraste; exhiben una diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95,0%.

Los resultados anteriormente obtenidos indican que el método de extracción donde se obtuvo mejores resultados en cuanto al color polimérico fue el método de extracción por fermentación alcohólica.

Como se evidenció en los resultados del diseño experimental para determinar el método de extracción donde se obtuvieron mejores resultados, fue el método tres que corresponde a la extracción por fermentación alcohólica ya que exhibió medias superiores en el contenido de antocianinas monoméricas y el color polimérico. Sin embargo, para la cuantificación de fenoles totales, el método EFA fue donde se obtuvo menores resultados, por debajo de EAM y de ES, esto se pudo deber a que el método de Folin Ciolteau, aunque se trata de un método simple, preciso y sensible, es un procedimiento donde interfieren diversas sustancias de naturaleza no fenólica y que pueden dar lugar a concentraciones de compuestos fenólicos aparentemente elevadas. Entre los compuestos que interfieren se encuentran los azúcares<sup>33</sup> y como se describió en el apartado 2.1, las levaduras (utilizadas en EFA) en el proceso de fermentación, realizan un proceso de transformación de glucosa a etanol y agua, lo cual pudo disminuir la cantidad de azúcares libres en extracto y por lo tanto la interferencia de estos compuestos a la hora de aplicar el método de Folin Ciolteau.

#### 4.4 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO:

Debido a que los métodos de extracción propuestos no son selectivos para la obtención únicamente de antocianinas; co-extraen además de estos, otro tipo de compuestos como azúcares o ácidos orgánicos<sup>73</sup>. Por lo anterior, se aplicó las técnicas de purificación mencionadas en el apartado 3.11 con el fin de aislar los compuestos de interés en el extracto crudo donde se obtuvo mejores resultados en cuanto a la cuantificación de los compuestos de interés que fue el método de extracción por fermentación alcohólica (EFA).

Durante el proceso de purificación, se evidenció que posterior a la elución de compuestos incoloros, con la recuperación del extracto rico en antocianinas (ERA) con etanol-ácido, la coloración del extracto retenido en la resina intensificó su coloración a un tono violeta oscuro, lo cual se debió a la mayor concentración del catión flavilio por influencia de la fase móvil con pH ácido<sup>74</sup>.

TABLA 60. Pesos para las tres muestras de ERA para EFA.

Peso de extracto puro EFA (g)		
Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
2,689	2,380g	2,221

Como se puede observar en la anterior tabla, las cantidades obtenidas de los ERA para las distintas muestras obtenidas por EFA.

Posteriormente se realizó la separación de antocianinas monoméricas y poliméricas por medio de cromatografía de exclusión molecular, donde se obtuvieron dos fracciones de antocianinas monoméricas de diferente coloración.

## 4.5 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS:

### 4.5.1 Análisis por HPLC:

Para identificar los componentes mayoritarios en ERA y las fracciones monoméricas, se partió del análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

En la siguiente figura se observa el perfil cromatográfico obtenido a la longitud de onda de 520 nm, para ERA:

<sup>73</sup> COUTINHO, M and QUADRI, M. Partial purification of anthocyanins from Brassica oleracea (red cabbage). En: Science and Technology. Vol 39, N° 16. (2004); p. 387

<sup>74</sup> JIMENEZ, J. Op. Cit.p., 58

GRÁFICA 14. Cromatograma

para ERA, fuente ésta investigación.

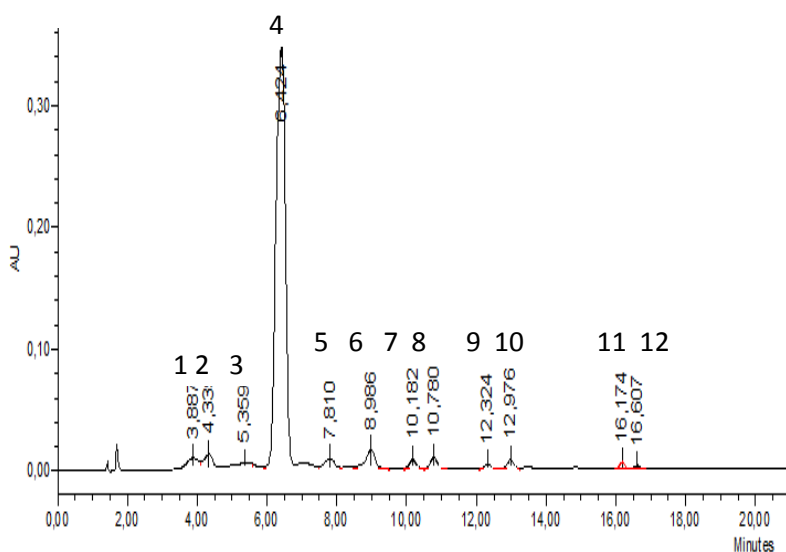


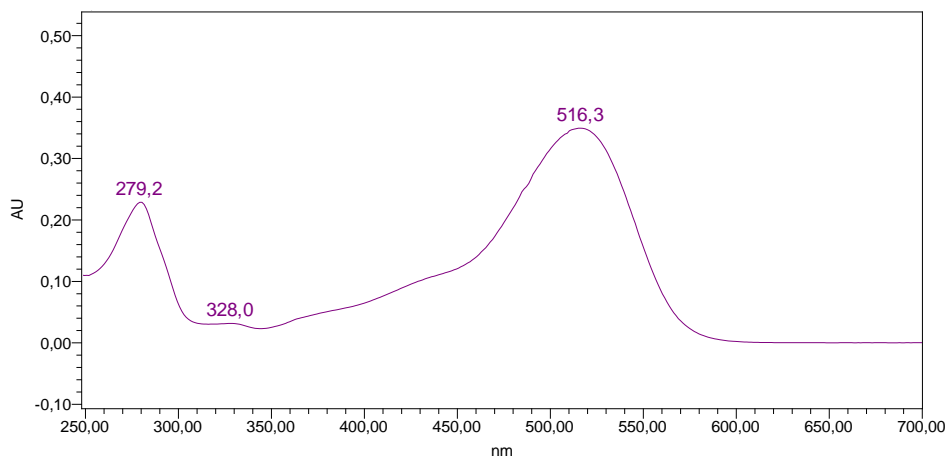
TABLA 61. Tiempos de retención compuestos para ERA

Señal	Tiempo de retención (min)	% Área
1	3,9	2,8
2	4,3	2,9
3	5,4	1,5

4	6,4	81,3
5	7,8	2,2
6	8,9	3,9
7	10,2	1,1
8	10,8	1,5
9	12,3	0,6
10	12,9	1,2
11	16,8	0,7
12	16,6	0,3

En el perfil cromatografico (GRAFICA 14); registrado a 520 nm se observa un pico mayoritario (tr : 6,42 min, y 81,3% de área), igualmente se observan otras señales que se encuentran en muy baja proporción. En la gráfica 15 se puede observar el perfil UV-Vis característico de las antocianinas, para la señal mayoritaria.

GRÁFICA 15. Perfil UV-vis para la señal 4 de ERA, fuente ésta investigación.



En el anterior espectro de absorción Uv-vis, se observa las bandas características de las antocianinas, lo cual confirmó la presencia de estos compuestos en ERA.

Posteriormente se analizó por la misma técnica (HPLC-DAD) las fracciones de antocianinas monoméricas, donde se obtuvo el siguiente cromatograma para la primera fracción:

GRÁFICA 16. Cromatograma para la fracción 1 de antocianinas monoméricas, fuente ésta investigación.

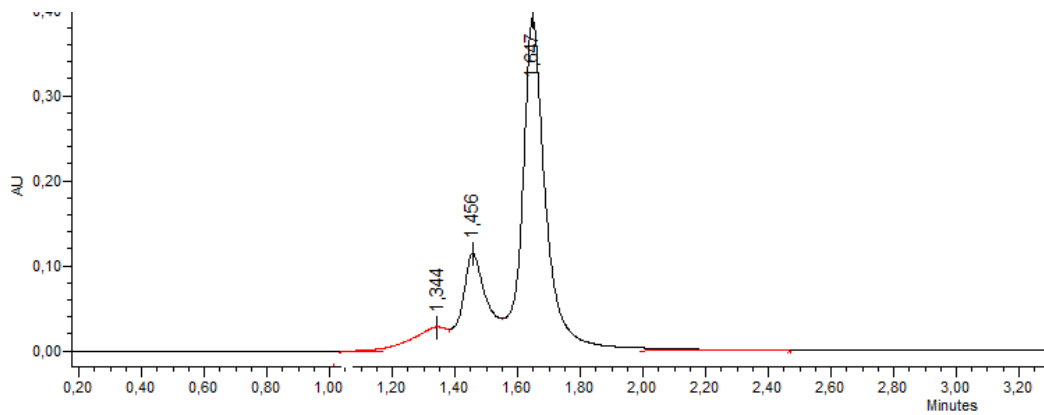


TABLA 62. Tiempos de retención para la fracción 1 de antocianinas monoméricas

Señal	Tiempo de retención (min)	% Área
1	1,3	7,5
2	1,5	21,8
3	1,6	70,7

La primera fracción de antocianinas monoméricas, se analizó por HPLC-DAD. Comparando con el cromatograma de ERA se evidencia que estos picos que salen a un tiempo de retención menor a 2 minutos, aparecen en baja intensidad en el cromatograma del extracto puro, por lo cual no aparece en la tabla de los porcentajes de área, sin embargo es evidente que se pudo aislar por CC a pesar de su baja concentración.

La segunda fracción de antocianinas monoméricas, igualmente se analizó por HPLC-DAD.

GRÁFICA 17. Cromatograma para la fracción 2 de antocianinas monoméricas, fuente ésta investigación.

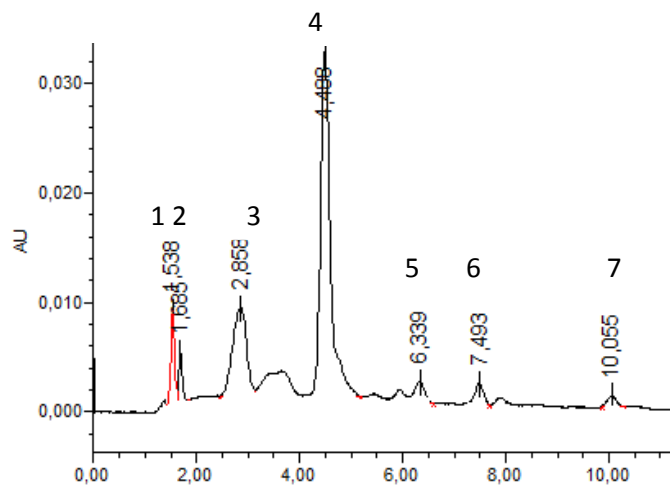


TABLA 63. Tiempos de retención para la fracción 2 de antocianinas monoméricas

Señal	Tiempo de retención (min)	% Área
1	1,5	6,3
2	1,7	3,1
3	2,8	21,7
4	4,5	60,4
5	6,3	3,7
6	7,5	2,9
7	10,1	1,8

Comparando los tiempos de retención de las señales obtenidas entre las fracciones de antocianinas monoméricas y ERA se evidencia algunas similitudes, como se puede ver en la siguiente tabla:

TABLA 64. Comparación de las señales obtenidas por las fracciones de antocianinas monoméricas con el extracto puro.

ERA	Fracción 2	Fracción 1 monoméricas
-----	------------	------------------------

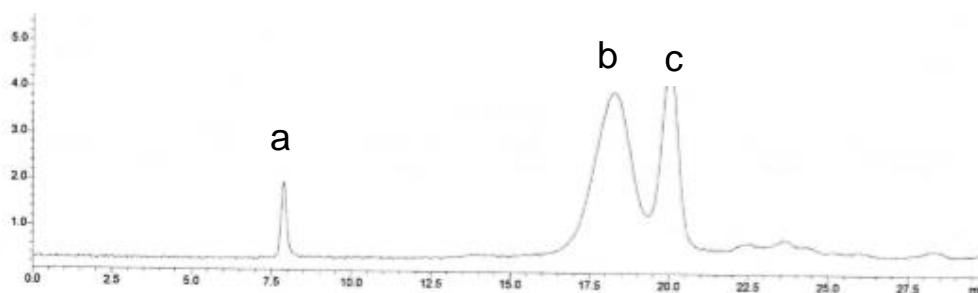
		monoméricas			
Señal	Tiempo de retención (min)	Señal	Tiempo de retención (min)	Señal	Tiempo de retención (min)
1	3,887	1	1,538	1	1,344
2	4,335	2	1,685	2	1,456
4	6,424	3	2,858	3	1,647
5	7,810	4	4,488		
6	8,986	5	6,339		
7	10,182	6	7,493		
		7	10,055		

Como se puede observar en la anterior tabla, hay algunas similitudes en los tiempos de retención entre las señales obtenidas del cromatograma de ERA y las fracciones de antocianinas monoméricas.

La similitud en los tiempos de retención de los compuestos fraccionados mediante la CC, indica claramente que ERA del fruto de pomorroso está constituido principalmente por antocianinas de tipo monomérico.

4.5.2 ANÁLISIS POR HPLC-SM: El perfil obtenido por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-SM) de ERA del fruto de pomorroso se observa en la siguiente gráfica:

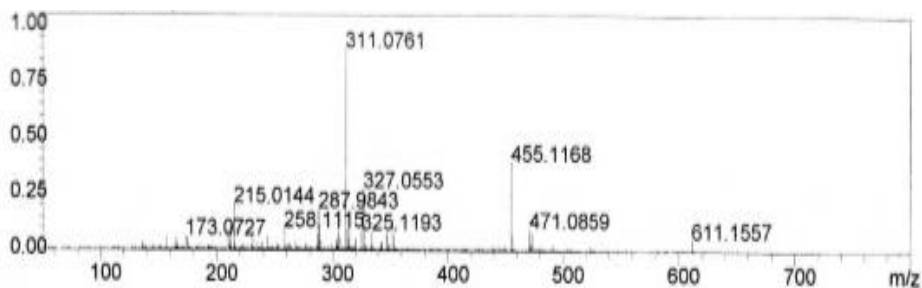
GRÁFICA 18. Cromatograma obtenido por HPLC-SM para ERA, fuente ésta investigación.



En el anterior cromatograma se evidencia la aparición de tres picos, los cuales fueron analizados por espectrometría de masas con el fin de identificar los iones fragmento. El espectro de masas para la señal a se observa a continuación:



GRÁFICA 19. Espectro de masas para la señal a, fuente ésta investigación.



En el espectro de masas se observa la fragmentación para la señal a, donde sobresalen cuatro señales intensas. La señal de relación  $m/z$  de 611, corresponde al ión molecular  $[M]^+$  de la antocianina, que se fragmenta hasta llegar a una  $m/z$  de 287, perteneciente a la cianidina. El ión molecular de  $m/z$  611 podría pertenecer a la estructura de la cianidina-3-cumaroilglucosa (figura 5)<sup>75</sup>. La estructura asignada corresponde a una aproximación de la molécula que genera la señal.

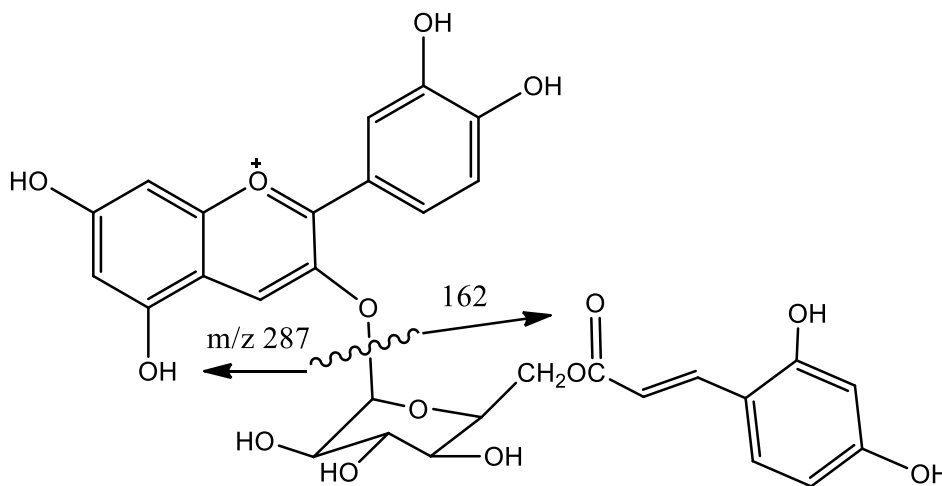
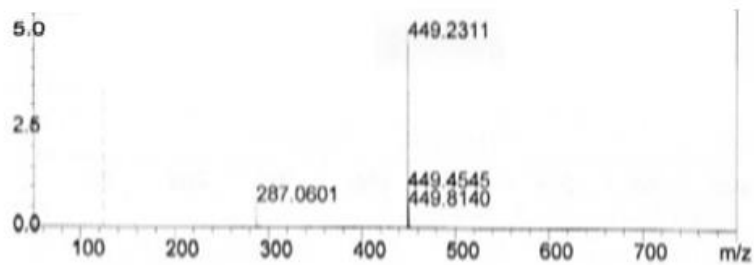


FIGURA 6. Estructura del posible compuesto correspondiente a la señal a, fuente ésta investigación.

El espectro de masas para la señal b se observa a continuación:

GRÁFICA 20. Espectro de masas para la señal b, fuente ésta investigación.



El espectro de masas para la señal b, muestra un espectro en el que sobresalen dos señales intensas. La señal de relación  $m/z$  de 449, corresponde al ión molecular  $[M]^+$  de la antocianina, que se fragmenta hasta llegar a una relación  $m/z$  de 287 que se genera por la pérdida de 162 unidades que puede corresponder a la cianidina<sup>76</sup>.

<sup>75</sup> WANG, H; RACE, E and SHRIKHANDE, A. Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography-mass spectrometry. En: *Journal of agricultural and food chemistry*. Vol 51. (2003); p. 1839-1844.

<sup>76</sup> LUCKER, J. *Op. Cit.*, 1482.

En este caso, el ión molecular correspondiente a la relación  $m/z$  449, podría ser originado por cianidina-3-galactósido, en donde se pudo evidenciar que la galactosa para este compuesto era el único glicosil enlazado a la antocianidina debido a que se encontró una única fragmentación de  $[M-162]^+$  a una relación de  $m/z$  de 287 (Figura 6).

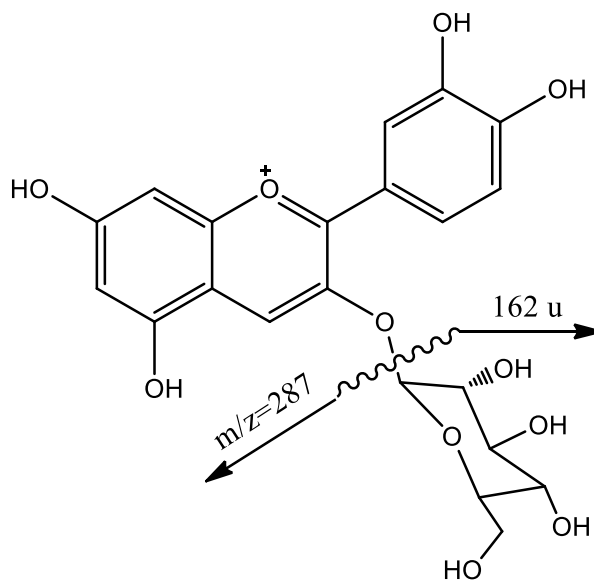
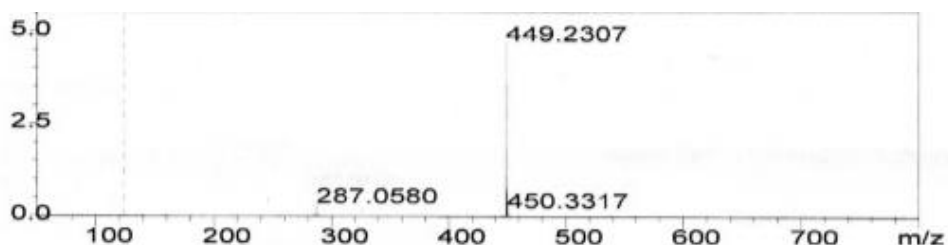


FIGURA 7. Estructura del posible compuesto correspondiente a la señal b, fuente ésta investigación.

El espectro de masas para la señal c se observa a continuación:

GRÁFICA 21. Espectro de masas para la señal c, fuente ésta investigación.



El ión molecular de m/z 449 podría pertenecer a la estructura de la cianidina-3-glucosido. Se pudo evidenciar que la glucosa para este compuesto era el único glicosil ya que se evidenció una fragmentación de  $[M-162]^+$  a una relación de m/z de 287 (Figura 7) correspondiente a la escisión de un hexosilo de la cianidina glicosilada<sup>77</sup>.

<sup>77</sup> CAO, S. Op. Cit.p., 213.

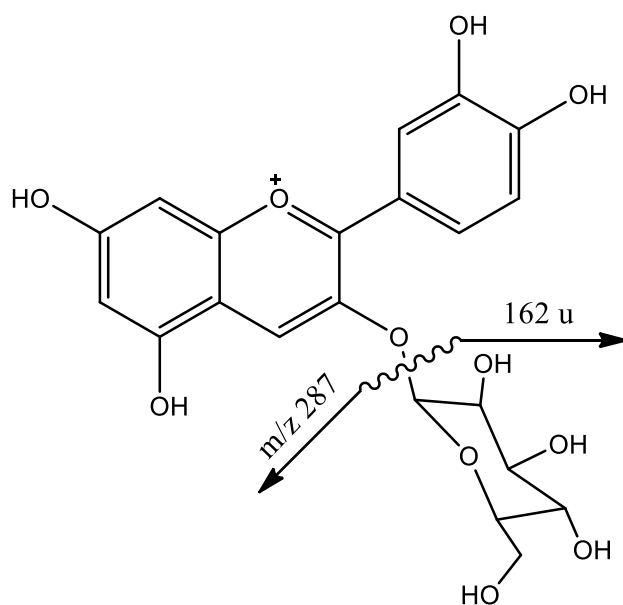


FIGURA 8. Estructura del posible compuesto correspondiente a la señal c, fuente ésta investigación.

Para los espectros de masas para las señales b y c, donde se puede evidenciar que tienen el mismo perfil de fragmentación, pero un tiempo de retención diferente, se

identificó como posible compuesto la cianidina-3-galactósido para la señal b, debido a que eluyó a un tiempo de retención menor que la señal c, que se identificó como posible compuesto la cianidina-3-glucósido. Lo anterior se dedujo debido a que se conoce que las antocianinas eluyen antes de sus correspondientes agliconas, donde se pueden diferenciar según los tiempos de retención, siendo así la delphinina la antocianidina que tiene un tiempo de retención más corto, seguido por la cianidina, peonidina y malvidina. De igual forma, para los diferentes grupos glucósidos con el mismo contenido antocianidinas se tiene en cuenta que el grupo que sale a un menor tiempo de retención corresponde a un galactósido, seguido por glucósido, arabinósido y por último; xilósido<sup>78</sup>.

Como se pudo evidenciar en los resultados obtenidos por HPLC-MS se pudo evidenciar que los posibles compuestos mayoritarios corresponden a cianidina con distintos sustituyentes. Este tipo de antocianidina es una de las más comunes presentes en las plantas; presente con mayor frecuencia en frutos. Además de ello, se encontró que en otros frutos estudiados de la familia MYRTACEAE, cianidina fue la antocianidina presente con mayor frecuencia<sup>78, 79</sup>.

---

<sup>78</sup> GEMA, F. Op. Cit.p., 4.

<sup>79</sup> MINUCCI, F. Op. Cit.p., 1833.

Este tipo de compuestos genera interés en los pigmentos antociánicos debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas ya que ejercen efectos terapéuticos que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatoria y antidiabética; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo. Los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante<sup>80</sup>.

---

<sup>80</sup> CHOU, P. Op. Cit.p., 652.

## CONCLUSIONES

En la determinación del contenido de fenoles totales en el extracto crudo de pomorroso se obtuvo que la extracción con solventes contiene un elevado contenido de fenoles totales, por encima de los resultados obtenidos por extracción asistida por microondas y por fermentación alcohólica, con un valor de 332,6 mg de ácido gálico/100 g de fruta. Este valor se comparó con el de otros frutos y se encontró que el mayor contenido de fenoles totales se presentaba en la fruta amazónica acerola con un contenido de 580,1 mg de ácido gálico/100 g de fruta. Sin embargo, el fruto de pomorroso presentó índices superiores que frutas como el acai, la fresa la mora, la uva, ivilan y mortiño.

Los resultados obtenidos para la cuantificación de antocianinas en cuanto al color polimérico se encontró que el método donde se obtuvo mejores resultados fue la extracción por fermentación alcohólica, al igual que el contenido de antocianinas monoméricas que indicó un valor de 79,8 mg cy-3-glu/100g de fruto. El valor se comparó con otros frutos y se encontró que el contenido de antocianinas monoméricas presentes en el fruto de pomorroso se encontraba dentro de los mayores, superior a frutos como la mora, uva, fresa, acai, o la acerola, pero por debajo de frutos como el ivilan y el mortiño.

Se pudo establecer que al aplicar los tres métodos de extracción correspondientes a la extracción con solventes, extracción asistida con microondas y extracción por fermentación alcohólica, los extractos crudos obtenidos indicaron el perfil característico de las antocianinas, sin embargo, en los resultados del diseño experimental para determinar el método de extracción donde se obtuvieron mejores resultados, se encontró que fue la extracción por fermentación alcohólica ya que exhibió medias superiores en el contenido de antocianinas monoméricas y color polimérico. Sin embargo, para la cuantificación de fenoles totales, el método EFA fue donde se obtuvo menores resultados, por debajo de EAM y de ES.

El análisis por HPLC de tipo analítico para el extracto rico en antocianinas obtenido por EFA, indicó un pico mayoritario que correspondió al 81 %. El cromatograma indicó señales con tiempos de retención similares a los cromatogramas obtenidos para las dos fracciones de antocianinas monoméricas, sin embargo, el análisis por HPLC-SM indicó tiempos de retención diferentes y menor cantidad de señales, lo cual se atribuyó a las condiciones de análisis.

Los constituyentes mayoritarios encontrados por HPLC-SM se identificaron tres posibles compuestos correspondientes a cianidina-3-cumaroilglucosa, cianidina-3-galactósido y cianidina-3-glucósido.



## RECOMENDACIONES

Se recomienda para futuras investigaciones optimizar la técnica de extracción por fermentación alcohólica, debido a que fue el método de extracción donde se obtuvo mejores resultados.

Es importante la elucidación de las estructuras moleculares de las antocianinas mayoritarias sugeridas en esta investigación, para lo cual se recomienda separar y purificar utilizando la técnica de HPLC de tipo analítico con el fin de realizar estudios de resonancia magnética nuclear ( $^{13}\text{C}$ -RMN,  $^1\text{H}$ -RMN, HSQC, HMQC, NOESY, TOCSY) ya que este tipo de técnicas, aclaran las dudas sobre los tipos de azúcar enlazados, y su configuración anomérica.

Es de gran interés para este tipo de compuestos evaluar la actividad antioxidante y eficiencia anti-radical, además de evaluar la estabilidad frente a factores como pH, luz, entre otros.



## BIBLIOGRAFÍA

- BRASSEUR, T. Propriétés anti-inflammatoires de flavonoides. En: J Pharmacol Bel. Vol 44. (1989); p. 241.
- CAO, S; PAN, S; YAO, X and FU, H. Isolation and Purification of Anthocyanins from Blood Oranges by Column Chromatography. En: Agricultural Sciences in China. Vol 9, N° 2. (2010); p. 215.
- CASTANEDA, A; PACHECO, L; PAEZ, E; RODRÍGUEZ, J and GALÁN, C. Chemical Studies of Anthocyanins: a review. En: Food Chemistry. Vol 113. (2009); p.871.
- CHARFUELAN, C. Estudio Químico de la Fracción de Polifenoles Tipo Antocianinas Aislada del Fruto de Ivilan (Monima Obtusifolia), Estabilidad Y Capacidad Antioxidante In Vitro. Pasto, 2012, Trabajo de grado (química). Universidad de Nariño. Facultad de ciencias exactas y matemáticas. Departamento de química. p. 112.
- CHOU, P; MATSUI, S; MISAKI, K and MATSUDA, T. Isolation and identification of xenobiotic aryl hydrocarbon receptor ligands in dyeing wastewater. En: Environmental Science and Technology. Vol. 41, N° 2. (2007); p. 657.
- COSTA, C; HORTON, D and MARGOLIS. Analysis of Anthocyanins in Foods by Liquid Chromatography, Liquid Chromatography- mass Spectrometry and Capillary Electrophoresis. En: Journal Chromatography. Vol 881. (2000); p.410.
- CULEBRAS, J; MARTINEZ, S; GONZALES y TUÑÓN, M. Plantas que contienen polifenoles. Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. En: Rev Nutrición Hospitalaria. Vol 17. (2002); p. 278.
- COUTINHO, M and QUADRI, M. Partial purification of anthocyanins from Brassica oleracea (red cabbage). En: Science and Technology. Vol 39, N° 16. (2004); p. 387
- DENEV, P; CIZ, M; AMBROZOVA, G; LOJEK, A; YANAKIEVA, I and KRATCHANOVA, M. Solid-phase extraction of berries anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. En: Food Chemistry. Vol 12. (2010); p. 106.
- ESCRIBANO, B; BEULGA, S and RIVAS, G. Anthocyanins in Cereals. En: Journal Chromatography. Vol 1054. (2004); p.141.
- FAN, G; HAN, Y; GU, Z and GU, F. Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato cultur. En: LWT. Vol. 41. (2007); p. 1412-1416.
- GEMA, F; KEYVAN, D; STURLAINNY, P ; KATHLEEN, W; ABDOULAYE, J. D; KURT, A; ROBERT, F; JEANINE, M and EDWARD, J. Anthocyanins from Eugenia brasiliensis edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment. En: Food Chemistry. (2012); p7.

HARDIGREE, A and EPLER, J. Comparative mutagenesis of plants flavonoids in microbial system. En: Mutation Res. Vol 58. (1978); p. 235.

HERNÁNDEZ, A and PRIETO, E. Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. En: Rev Cubana Invest Biomed. Vol 18. (1999); p. 14.

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

JIMENEZ, J; y VILLAREAL, J. Estudio químico de pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del motilon (*Hieronimamacrocarpa*). Pasto, 2008, Trabajo de grado (química). Universidad de Nariño. Facultad de ciencias exactas y matemáticas. Departamento de química. p. 103.

INFORMACIÓN DEL POMORROSO. <http://pomorrososano.blogspot.com/>. Consultado 09/12/2013.

INVESTIGACIÓN DE ANTOCIANINAS. <http://www.redalyc.org/pdf/579/57922783007.pdf>. Consultado: 09/06/2013.

KONCZAK, I and ZHANG, W. Anthocyanins more than nature's colours. En: Journal of Biomedicine and Biotechnology. Vol 5. (2004); p 240.

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

KÜHNAU, J. The Flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. En: World Rev Nutr Diet. Vol 24. (1976); p. 190.

KURT, A; HUI, Y;BEI, J; BASILE, M and EDWARD J. Analytical Methods Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. En: Food Chemistry. Vol 109. (2012); p 890.

KUSKOSKI, E; VEGA, J; RIOS, J; ROSEANE, F; ANA, M and ASUERO,A. Characterization of Anthocyanins from the Fruits of Baguacu (*Eugenia umbelliflora* Berg). En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol 51. (2003); p. 5454.

LEE, J; RENNAKER, C and WROLSTAD, R. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. En: Food Chemistry. Vol 110. (2008); p. 786.

LETAN, A. The relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivatives. En: J Food Sci. Vol 31. (1966); p.523.

LONGO, L; SCARDINO, A; VASAPOLLO, G and BLANDO, F. Anthocyanins from *Eugenia myrtifolia* Sims. En: Innovative Food Science and Emerging Technologies. Vol 8. (2007); p. 332.

LONG, Y; CHUN-YE, C; XIN, J; MAN-TIAN, M; BIN, Y; HUI, C; WEN-HUA, L and TING, Z. Structural requirements of anthocyanins in relation to inhibition of endothelial injury induced by oxidized low density lipoprotein and correlation with radical scavenging activity. En: Febs Letter. Vol 584. (2010); p. 590.

LÜCKER, J; MARTENS, S and LUND, T. Characterization of a *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon 3,5-O-methyltransferase showing strong preference for anthocyanins and glycosylated flavonols. En: Phytochemistry. Vol 17. (2010); p. 1484.

LUI, R; PING, W; QING-QI, G and ZHEN-YU, W. Anthocyanin composition and content of the *Vaccinium uliginosum* berry. En: Food Chemistry. Vol 125. (2011); p. 116-120.

MINUCCI, C; SIQUEIRA, H y DAMETTO, A. Estudo fitoquímico e das atividades antioxidante e antimalárica de myrciaria cauliflora berg. (MYRTACEAE). En: FAPESP. (2008); p. 1837.

OSORIO, C; HURTADO, N; DAWID, C; HOFMANN, T; HEREDIA, F and MORALES, A. Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes Berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits. En: Food Chemistry. Vol 132. (2012); p. 1915-1921.

PRIOR, R; WU, X and SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 53 N°10. (2005); p. 4290-4302.

REVISTA DE NUTRICIÓN.  
[http://www.nutricion.org/publicaciones/revista\\_agosto\\_03/Funcionales/vegetales,vitaminas,polifenoles.pdf](http://www.nutricion.org/publicaciones/revista_agosto_03/Funcionales/vegetales,vitaminas,polifenoles.pdf). Consultado 23/04/2012.

ROSS, J and KASUM, C. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. En: Annu Rev Nutr. vol 22. (2002); p.34.

SEVERO, P. Estadística experimental aplicada a ciencias e ingeniería. Ed. CONCYTEC. Consejo Nacional de ciencia, tecnología e innovación tecnológica. Ministerio de educación Perú; p. 50.

STAHL, W; ALE-AGHA, N and POLIDORI, M. Non-antioxidant properties of carotenoids. En: Biol Chem. Vol 383. (2002); p. 558.

VAZQUEZ, H and ACOSTA, O. Alcoholic fermentation: An option for renewable energy production from agricultural residues. En: Ingeniería Investigación y Tecnología. Vol 8. N° 4. (2007); p. 259.

VRIJSEN, R; EVERAERT, L and BOETÉ, A. Antiviral activity of flavones and potentiation by ascorbate. En: J Gen Virol. Vol 69. (1988); p.1751.

WANG, H; RACE, E and SHRIKHANDE, A. Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography-mass spectrometry. En: Journal of agricultural and food chemistry. Vol 51. (2003); p. 1839-1844.

YANG, K and LAMPRECHT, S. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. En: Journal Carcinogenesis. Vol 21. (2000); p. 1660.

YANG, Z and ZHAI, W. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC-MS. En: Innovative Food Science and Emerging Technologies. Vol. 11. (2010); p. 476.

ZHANG, Y; JAYAPRAKASAM, B; SEERAM, N; OLSON, L; DEWITT, D and NAIR, M. Insulin Secretion and Cyclooxygenase Enzyme Inhibition by Cabernet Sauvignon Grape Skin Compounds. En: Journal Agricultural and Food Chemistry. Vol 52. (2004); p.233.