

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TEXTIL



**“PROCESO TECNOLÓGICO DE LA EXTRACCIÓN DE
ANTOCIANINAS DE LA MISHQUIPANGA**

“(RENEALMIA ALPINIA)”

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO QUIMICO**

PRESENTADO POR:

BACH. HUALPA AMABLE JORGE LUIS.

BACH. LOARTE MISAYAURI BENJAMÍN EDUARDO.

LIMA - PERU

2010

ii
Índice

Descripción	Página
Introducción.....	7
Capítulo I: Generalidades	
1.1. Definición de la Materia Prima - La Mishquipanga.....	11
1.1.1. Aspectos generales.....	11
1.1.2. Clasificación taxonómica.....	12
1.1.3. Variedades.....	12
1.1.4. Características botánicas.....	14
1.1.5. Composición proximal.....	20
1.1.6. Habita.....	21
1.1.7. Cultivo.....	21
1.1.8. Usos.....	22
1.1.9. Plagas que la atacan.....	22
1.1.10. Producción de mishquipanga en el Perú.....	22
1.2. Colorantes en la mishquipanga.....	23
1.2.1. Flavonoides.....	23
1.2.1.1. Clasificación y estructura.....	23
1.2.1.2. Propiedades y características espectrales de los flavonoides.....	29
1.2.1.3. Función de los flavonoides en las plantas.....	34
1.2.1.4. Contribución para el color de la flor.....	36
1.2.2. Antocianinas.....	37
1.2.2.1. Hidroxilación básica de las antocianidinas naturales.....	38
1.2.2.2. Caracterización de varios tipos de glicosidación y acilación.....	41
1.2.2.3. Efectos del cambio de pH.....	49

1.2.2.4. Efectos de la estructura en la estabilidad del color de las antocianinas.....	54
1.2.2.5. Reacciones de oxidación.....	57
1.2.2.6. Extracción de antocianinas.....	62
1.2.2.7. Propiedades espectrales.....	64
1.2.2.8. Método de determinación de antocianinas totales e índice de degradación para el jugo de arándanos.....	70
1.2.2.9. Identificación de antocianinas y antocianidinas naturales	86
Capítulo II: Desarrollo experimental de la separación de las antocianinas de la mishquipanga	
2.1. Muestreo.....	99
2.2. Preparación del fruto (mishquipanga).....	99
Procedimiento.....	99
2.2.1. Selección.....	99
2.2.2. Pelado.....	99
2.2.3. Secado.....	100
2.2.4. Cálculo del contenido de humedad en la cáscara.....	100
2.2.5. Ubicación de las antocianinas en el cuerpo del fruto.....	101
Resultados.....	101
2.3. Extracción de las antocianinas de la mishquipanga	107
2.3.1. Determinación de las antocianinas totales e índice de degradación para la mishquipanga.....	109
Procedimiento.....	109
2.3.1.1. Selección del blanco.....	109
2.3.1.2. Cálculo de antocianinas totales por el método de pH diferencial.....	109

2.3.1.3. Cálculo de antocianinas totales por el método de pH simple.....	111
2.3.1.4. Cálculo del índice de degradación.....	111
Resultados.....	112
2.3.1.5. Determinación del blanco.....	112
2.3.1.6. Cálculo de antocianinas totales por el método del pH diferencial.....	112
2.3.1.7. Cálculo de antocianinas totales por el método de pH simple.....	114
2.3.1.8. Cálculo del índice de degradación.....	114
2.3.2. Efecto del pH.....	116
Procedimiento.....	116
Resultados.....	117
2.3.3. Efecto de la composición de solvente.....	118
Procedimiento.....	118
Resultados.....	120
2.3.4. Efecto de la temperatura.....	122
Procedimiento.....	122
Resultados.....	123
2.3.5. Efecto de la relación solvente/cáscara.....	124
Procedimiento.....	124
Resultados.....	125
2.3.5.1. Temperatura de 70 °C.....	126
2.3.5.2. Temperatura de 50 °C.....	131
2.4. Concentración de Antocianinas.....	135
Procedimiento.....	135
Resultados.....	136

2.5. Secado	139
2.5.1. Secado por aspersión (Spray Dryer).....	139
Procedimiento.....	139
Resultados.....	141
2.5.2. Secado por estufa.....	144
Procedimiento.....	144
Resultados.....	145
2.6. Caracterización.....	146
2.6.1. Naturaleza química del colorante.....	146
Procedimiento.....	146
2.6.1.1. Prueba espectrofotométrica UV-Visible.....	147
2.6.1.2. Prueba de coloración para diferenciar antocianinas de betacianinas.....	147
Resultados.....	148
2.6.1.3. Prueba espectrofotométrica UV-Visible.....	148
2.6.1.4. Prueba de coloración para diferenciar antocianinas de betacianinas.....	148
2.6.2. Identificación del esqueleto-antocianidina.....	152
Procedimiento.....	152
2.6.2.1. Hidrólisis de las antocianinas de la mishquipanga.....	152
2.6.2.2. Purificación por cromatografía en papel bidimensional....	154
2.6.2.3. Selección de la fase móvil.....	155
2.6.2.4. Identificación de las antocianinas individuales por medio de sus espectros UV-Visible.....	156
2.6.2.5. Identificación final de las antocianinas individuales por medio del Rf.....	156
Resultados.....	157
2.6.2.6. Purificación por cromatografía en papel bidimensional....	157

2.6.2.7. Identificación de las antocianinas individuales por medio de sus espectros UV-Visible.....	161
2.6.2.8. Identificación final de las antocianinas individuales por medio del Rf.....	166
CAPÍTULO III: Balance de masa, energía y de costos	
3.1. Balance de masa.....	168
3.1.1. Condiciones a evaluar.....	169
3.1.2. Balance.....	171
3.2. Balance de energía.....	173
3.3. Costo.....	173
3.3.1. Costo de materiales.....	174
3.3.2. Costo de energía.....	174
CAPÍTULO IV: Propuesta de proceso a nivel planta piloto	
4.1. Almacén de cáscaras secas.....	176
4.2. Preparación previa a la extracción.....	176
4.3. Extracción.....	176
4.4. Centrifugación y decantación.....	178
4.5. Concentración.....	178
4.6. Secado.....	179
Conclusiones y recomendaciones.....	181
Bibliografía.....	186
Glosario de términos.....	192
Apéndice N° 1.....	194
Apéndice N° 2.....	196
Apéndice N° 3.....	203
Apéndice N° 4.....	208
Apéndice N° 5.....	213

INTRODUCCIÓN

Aunque en nuestro país, muchos de los recursos naturales, han sido estudiados y explotados para la industria, como la uña de gato, la maca, el yacón, etc; en nuestra selva aún hay recursos silvestres esperando un estudio técnico para su aprovechamiento, como la Mishquipanga. Este fruto silvestre se presenta en tres variedades y en tiempos antiguos los pobladores de Moyobamba (provincia de San Martín) se alimentaban de su pulpa y daban uso al colorante que encontraron en su cáscara. Hasta que la modernización afectó a los nativos, quienes en su afán de integrarse a la sociedad moderna olvidaron éste fruto. También, aquellos que nunca oyeron hablar de ésta planta, la vieron como mala hierba y cortándola evitaron su propagación, por lo que, ahora, se encuentra ausente en los bosques.



Santa Rosa De Coccocha (izquierda) cosechando variedad 1, Pabloyacu (derecha), señalando una flor de la variedad 1, que recién brota.

Así fue, hasta que en el año 2002, la observación e iniciativa de Junior Chacón Flores, poblador de Moyobamba, hizo que presentara ésta planta a un concurso, organizado por Concytec, donde mostró los beneficios de la tinta que expelía la cáscara, para teñir polos, cargar lapiceros y pintar pizarras. Luego de concursar a nivel nacional, dicho proyecto sobresalió y con el fin de darle un uso industrial se llevó a la Universidad Nacional De Ingeniería, para analizarlo. Aquí, es donde se realizó el estudio experimental a una de las variedades en que se presenta la planta, siendo la escogida la **Variedad 1** (ver pág. 7), aún así mencionamos las características naturales de las otras variedades solamente en el Capítulo 1. El mencionado estudio se desarrolla como trabajo de investigación, para optar el título en Ingeniería Química, y se realiza en la Universidad Nacional de Ingeniería, en las instalaciones de los laboratorios de Investigación y Química Aplicada, N° 21 y de Operaciones Unitarias, N° 23 y comprende el estudio de la extracción, concentración, secado y caracterización de las antocianinas en la mishquipanga (*Renealmia alpinia*) como una alternativa, en un futuro, para el campo de la industria de alimentos ya sea en embutidos, bebidas y confitería en general.

La primera labor es la identificación del tipo de compuesto químico que le da el color a ésta planta, que bueno, por un simple análisis espectrofotométrico UV-Visible y unas pruebas químicas se llega a la conclusión de que los principales compuestos químicos que le dan el color a la cáscara de la Mishquipanga son **Antocianinas**. Seguidamente, se estudian los parámetros implicados en la extracción, a nivel laboratorio: formulación de solventes, pH del solvente extractor, temperatura de extracción y relación solvente/cáscara. En la concentración de antocianinas: Índice De Degradación, tiempo de concentración, pérdida de antocianinas, porcentaje de sólidos, etc. El secado se realiza en el equipo de Secado Por Aspersión del Laboratorio de Operaciones Unitarias y concluyendo el estudio se procede a caracterizar las antocianidinas del producto seco, para lo cual se hidroliza las

antocianinas para llevarlas a antocianidinas y se aíslan cada una de ellas en corridas cromatográficas para su posterior identificación mediante sus propiedades espectrofotométricas en la región UV-Visible y otros comportamientos químicos.



Poblador De Moyobamba, Junior Chacón Flores, quién llevó la tinta de la Mishquipanga a la XII Feria Escolar Nacional De Ciencia Y Tecnología.

Así también en el presente trabajo se brindará información teórica (1.2.2.) y aplicada (Apendice No. 5) sobre las Antocianinas en general, compuestos químicos, que según literaturas como la de Olga Lock Sing de Ugaz ³⁰ son calificadas como inocuas para el ser humano, con propiedades antioxidantes y ser responsable de muchos colores en flores y plantas. Los datos mencionados y los resultados del presente trabajo

apoyarían a un estudio futuro sobre la aplicación del colorante natural, extraído de la mishquipanga, en la producción de alimentos, aquí se puede observar el valor que guarda la presente Tesis de investigación. Finalmente, cabe recalcar, que éste fruto no ha sido estudiado hasta donde se sabe, no se encuentra información sobre éste en Lima, por lo que se tuvo que ir a Moyobamba donde se logró recopilar algo de información, gracias a la colaboración de la Universidad Nacional San Martín y profesionales en Agronomía, que ayudaron a describirla desde el punto de vista botánico y agronómico, para lo cual se tuvo que explorar muchos bosques no sólo para recolectar, sino para tener una idea, sobre su abundancia actualmente y así se visitaron lugares como Pabloyacu, San Lorenzo, Santa Rosa De Cococha, La subida del puerto de Tahuishco, etc.

CAPÍTULO I:

GENERALIDADES

1.1 DEFINICIÓN DE LA MATERIA PRIMA - LA MISHQUIPANGA

1.1.1 Aspectos generales

La Mishquipanga es originaria de la selva peruana, siendo planta silvestre es una de las menos estudiadas por el hombre, hasta la fecha. Se le ha encontrado en los departamentos de San Martín e Iquitos pero también se ha reportado su presencia en ciertos países como Brasil y Panamá, siendo otras variedades. La palabra Mishquipanga viene de los vocablos quechuas: ***Mishqui*** = ***rico, agradable*** y ***Panga*** = ***fruto***. En ciertos lugares de la Provincia de Moyobamba de la región de San Martín, como Yuracyacu, le conocen con el nombre de ***Ruhami*** que significa ***“la no amada”***

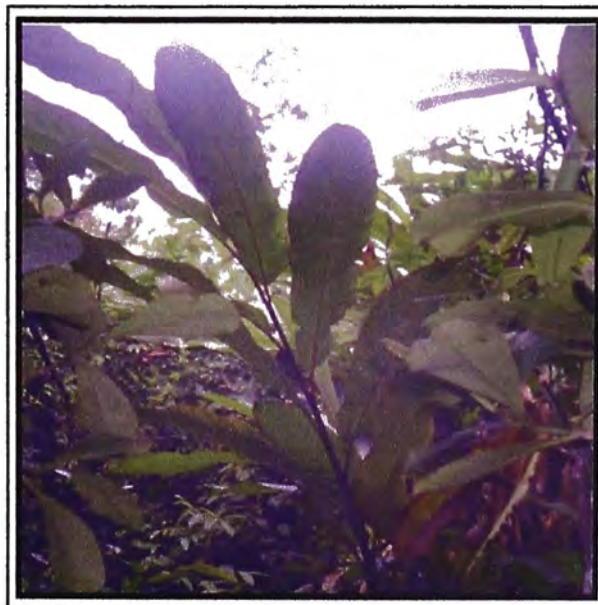


Fig. 1.1. La Mishquipanga, en su hábitat natural, Sta. Rosa De Coccocha, Provincia de Moyobamba, San Martín

1.1.2 Clasificación taxonómica

Pertenece a la familia Zingiberaceae, del género *Renealmia* y especie *alpinia*. Así su nombre científico es *Renealmia alpinia*, en algunas literaturas como la de Olga Lock Sing de Ugaz³⁰, aún se le encuentra con el nombre de *Renealmia macrantha*, pero estudios más actuales se expresan otorgándole el nombre científico mencionado primero.

1.1.3 Variedadesⁱ

Las variedades que se han encontrado hasta la fecha, se distinguen unos de otros por características como textura de la hoja, inflorescencia, fruto, etc. En Moyobamba, se han reportado tres variedades diferentes, que para el caso del presente estudio se le nombra como variedad 1, variedad 2 y variedad 3.

La variedad 1, es de inflorescencia compacta, consta de un fruto con su flor de un buen desarrollo y posición en el fruto, característicos. En la fig. 1.2. se puede observar, la baya y la flor de color amarillo sobre él, además al abrir la cáscara se puede observar que en la piel se almacena una cantidad importante del colorante y la otra parte leñosa es escasa de pigmento. Sus hojas presentan una textura lisa en ambos lados y por lo general la parte expuesta a la luz un color verde oscuro característico.

La variedad 2 diferencia de los otros por sus hojas, en cuya parte oculta a los rayos solares se puede percibir una textura aterciopelada característica y el envés presenta un color también por lo general, verde oscuro. Su inflorescencia es compacta como en el caso anterior pero a diferencia de la

ⁱ Descripción, colaboración del Ingeniero Juan José Pinedo Canta - CIP 40411 - Fac. Ecología-UNSM-T / Moyobamba

misma los carpelos de sus frutos muestran en su totalidad la tinta oscura, tanto en la parte de la piel como en el endocarpo; y no hay desarrollo de flor, es decir todo es una baya esférica, tal y como se puede observar en la fig. 1.3.



Fig. 1.2. Inflorescencia compacta de la Variedad 1.



Fig. 1.3. La Variedad 2 y su inflorescencia compacta también.

La variedad 3 presenta una inflorescencia laxa con las bayas parecidas a la variedad 2, es decir, sin desarrollo de flor y con todo el carpelo cubierto de tinte. Y como se puede observar en la fig. 1.4., las bayas de apariencia oscura, de color negro para ser más específicos, hay bastante similaridad entre la variedad 2 y la variedad 3, en el aspecto físico, excepto por el detalle de tipo de inflorescencia.



Fig. 1.4. Inflorescencia laxa que presenta la Variedad 3. Sus bayas son parecidas a las de la Variedad 2.

1.1.4 Características botánicas¹

La planta es una especie herbácea de 2 a 6 m. de alto (Fig. 1.1.), cuyas características morfológicas son:

- El tallo, es un pseudo-tallo que se origina de un rizoma, sostenida por un bulbo (tallo subterráneo). Está conformada por la vaina de la hoja, que se ubica en forma envolvente y buen desarrollo fibroso. El rizoma

¹ Descripción, colaboración del Ingeniero Juan José Pinedo Canta - CIP 40411 - Fac. Ecología-UNSM-T / Moyobamba

además presenta nudos, en cada una de ellas se desarrolla raíces reservantes y por lo menos un brote que se desarrollará y formará un hijuelo (planta hija) o nueva planta. Así sucesivamente se multiplica aunque el rizoma original después de fructificar llega a morir, dejando libre la proliferación de los brotes o hijuelos, el mismo que continuará con el desarrollo de la plantación. Las raíces reservantes almacenan agua y nutrientes, en la cantidad necesaria para mantener y proporcionar en el requerimiento del nuevo brote en desarrollo, hasta que pueda emitir sus propias raíces reservantes y absorbentes. En la Fig. 1.5. se muestra un rizoma y una parte del tallo, donde se puede observar, los nudos donde se desarrollaron plantas hijas y otras que dieron forma a raíces reservantes y saliendo de ellas, raíces absorbentes, que casi no se puede mostrar, por ser de minúsculo tamaño.



Fig. 1.5. Tallo, rizoma, bulbos y raíces de una muestra de la planta Mishquipanga.

- Las hojas, son simples sin pecíolo, con una vaina desarrollada; el folíolo, es una lámina en la cual se observa una nervadura principal acanalada, como una prolongación del pseudo-tallo y las nervaduras secundarias parten de la nervadura principal en forma oblicua. El as es de color verde oscuro y el envés es de un color verde claro, de textura lisa. La hoja presenta un aroma típico específico con mayor desprendimiento al frotar o estrujar con los dedos fragmentos de la hoja. (Fig. 1.6).



Fig. 1.6. Hojas de la mishquipanga.

- La flor está constituida por una inflorescencia en racimo que puede ser compacta o laxa. Cada flor presenta pequeños pétalos isépalos. La inflorescencia se origina en la parte basal de la planta y el desarrollo de maduración de los frutos se inicia de manera basal en cada inflorescencia. Las Figuras 1.7. y 1.8., muestran una inflorescencia cuando recién brota y otra ya desarrollada, donde se observa su posición basal, en su hábitat natural en Moyobamba.



Fig. 1.7. Dos muestras de la inflorescencia cuando recién brota como una flor.



Fig. 1.8. Inflorescencia desarrollada de la variedad 1.

- El fruto es una baya de forma esferoidal y de color azul oscuro al estado maduro, conformada por tres carpelos, unidos por sus bordes; al abrir el fruto presenta un ligero aroma similar al olor de las hojas. El espesor de los carpelos es variable dependiendo de la variedad, en las tres el pericarpo (la parte del fruto que cubre las semillas) consta de dos partes bien diferenciadas, el exocarpo (la piel que cubre el fruto, como una delgada película) y un endocarpo leñoso (más consistente en la variedad 1) que produce en el interior una pulpa, en el que se encuentran las semillas unidas por el arilo que tiene un color amarillo, para el caso de la variedad 2 y en las otras variedades 1 y 3 de color naranja. Lo cual indica una característica intraespecífica. La Fig. 1.9. muestra la evolución del crecimiento de una baya hasta su madurez en la inflorescencia.

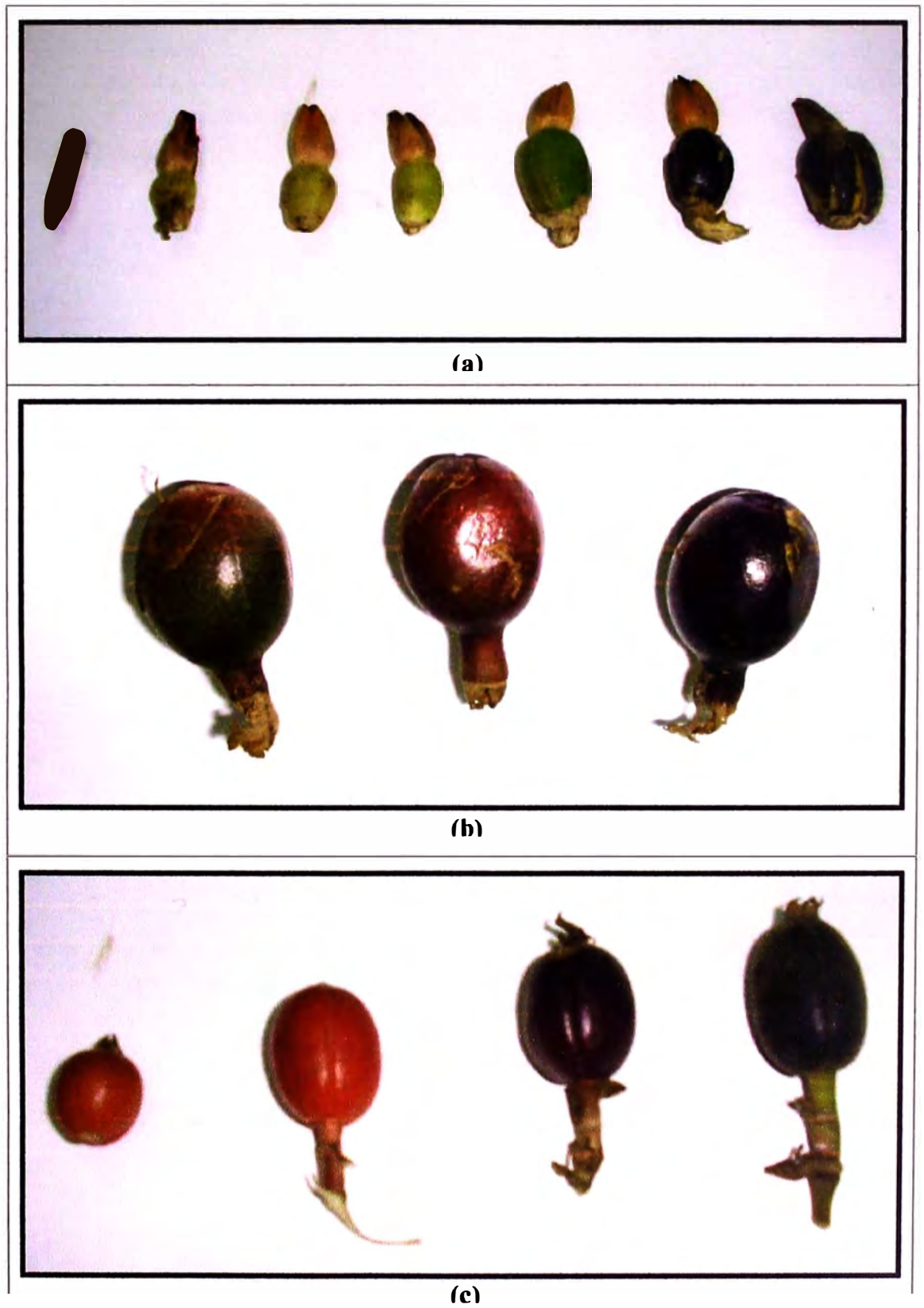


Fig. 1.9. Evolución del crecimiento de una baya. (a): Variedad 1. (b): Variedad 2. (c): Variedad 3.

- La raíz se presenta de dos maneras, una reservante de mayor desarrollo y otras absorbentes de menor desarrollo y poco tiempo de duración (Fig. 1.10).



Fig. 1.10. Raíz reservante y las raíces absorbentes.

- Las semillas son pequeñas y tienen un color marrón oscuro y otros negrusco. Las semillas están ordenadas, dentro del fruto, en tres grupos, según la forma de los carpelos.

1.1.5 Composición proximal¹

El siguiente reporte técnico, es pertinente mostrarlo, como base para el conocimiento de la naturaleza bioquímica de las tres variedades y se pueda realizar una categorización pertinente frente a otras especies vegetales.

¹ *Análisis Químico proporcionado por la facultad de Ciencias-Laboratorio No.12-Química-Universidad Nacional de Ingeniería-Lima*

Tabla 1.1
Composición Proximal de las tres variedades de la Mishquipanga

Ensayos	% en peso					
	Variedad 1		Variedad 2		Variedad 3	
	Pulpa	Cáscara	Pulpa	Cáscara	Pulpa	Cáscara
Proteína	4.92	0.82	5.06	0.78	4.97	0.80
Grasa	0.96	0.15	1.12	0.17	0.98	0.11
Sales minerales	2.80	3.16	2.91	4.89	2.85	4.23
Fibra	9.89	29.14	10.31	33.07	10.17	32.11
Carbohidratos	81.43	66.73	80.60	61.09	81.03	62.75
Total	100.00	100.0	100.00	100.00	100.00	100.00

Fuente: Informe Técnico No. 1430 – 07 LAB 12 Facultad de Ciencias- Universidad Nacional De Ingeniería / M. Sc. Otilia Acha De La Cruz , – Responsable de la evaluación técnica (28-12-2007)

1.1.6 Hábitatⁱ

La Mishquipanga crece usualmente en climas tropicales y sub-tropicales en suelo seco a semi-húmedo y de suelo de pH neutro a ligeramente ácido. En muchos casos se le ha encontrado en suelo con abundante materia orgánica.

1.1.7 Cultivoⁱ

La propagación, se produce por rizomas y por semillas. El tiempo de cosecha es de tres años aproximadamente, después de sembrada la semilla, después de ello el fruto que se desarrolla pasa de la maduración a la muerte (secándose), regresando a la misma tierra para propagarse a través de las semillas.

ⁱ Descripción, colaboración del Ingeniero Juan José Pinedo Canta - CIP 40411 - Fac. Ecología-UNSM-T / Moyobamba

1.1.8 Usos¹

En comunidades nativas cocinan la pulpa de manera tradicional envuelta en bijao (hojas de plantas que usan para envolver algunas comidas), el arilo y las semillas se retiran después de media hora de puesta la pulpa en la brasa, éste hábito muy antiguo aún se practica. El colorante de la cáscara era usado también para ropa nativa y otras manualidades.

1.1.9 Plagas que la atacan¹

Suele ser atacado muy pocas veces por piojo blanco (*pinnaspis spp*); plaga importante en cítricos como el palto, entre otras especies frutales.

1.1.10 Producción de mishquipanga en el Perú¹

La producción en nuestro país se realiza de manera natural. En algunas comunidades nativas, antiguamente, crecía en mayor cantidad y los habitantes usaban tanto el pigmento de la cáscara como la pulpa, ahora sólo puede observarse en ciertas zonas de San Martín, sin contar con los lugares que aún no han sido explorados. Es evidente el proceso de extinción en que se encuentra ésta especie herbácea silvestre, de nuestra selva amazónica, que con tantas propiedades de buen futuro económico, se espera que siga siendo estudiada por el hombre.

¹ *Descripción, colaboración del Ingeniero Juan José Pinedo Canta - CIP 40411 - Fac. Ecología-UNSM-T / Moyobamba*

1.2 COLORANTES EN LA MISHQUIPANGA

1.2.1 Flavonoides.

De toda la vegetación, que la naturaleza nos muestra en verano, el color que más nos rodea es, predominantemente, el verde. Por consiguiente, no es sorprendente que las plantas o partes de las plantas que están ligadas fuertemente a este verdor siempre hayan atraído al hombre y otros seres vivos del reino animal. Aunque varias tonalidades de amarillo son agradables a la mayoría de las personas, los colores más fascinantes son esos que hacen las combinaciones más profundas al verde, es decir, varios tonos de rojo y azul. Casi todos los colores brillantes de este tipo que son encontrados en flores y frutos son debido a la presencia de uno o más grupos de compuestos de flavonoides como por ejemplo la antocianina. Otras clases de flavonoides son responsables de la coloración amarilla de ciertas flores, aunque usualmente es debido a la presencia de carotenoides. También otros tipos de flavonoides dan su color blanco a las flores, que sin ellas quizá estas serían translúcidas. Finalmente algunos de los pigmentos marrones y negros se encuentran en la naturaleza debido a que los productos de oxidación de los flavonoides están relacionados con componentes fenólicos o a sus quelatos con metales.

1.2.1.1 Clasificación y estructura.

El término flavonoide fue utilizado por primera vez por Geissman y Hinreiner ¹⁵ en 1952, para nombrar a todos aquellos componentes cuya estructura está basada en la flavona (Estructura II, pág. 17). Ocasionalmente el término mal usado es flavonoide, pero realmente el nombre del

esqueleto es Flavano (Estructura III, pág. 17). Un número de otros términos han sido, y todavía son utilizados en forma común al abarcar varios grupos de flavonoide; por ejemplo, antoxantinas y como anteriormente se menciona la antocianina. Este último término fue por primera vez introducido y descrito como un tipo de flavonoide (como antocianinas) por Marquat³² en 1835.

Se conocen como diez clases de flavonoides, todos contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico y están arreglados bajo un sistema C₆-C₃-C₆, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C. Puede observarse que la Flavona (Estructura II, pág. 17) consiste de dichos anillos bencénicos (A y B) unidos a través de tres carbonos los cuales se forman dentro de un anillo γ -pirona. La variedad de compuestos de flavonoides sólo difieren uno de otro por el estado de oxidación de dicha unión 3-C. Hay una limitación del número de estructuras comúnmente encontradas en la naturaleza, que varía en sus estados de oxidación desde las flavan-3-oles (catequina; Estructura IV, pág. 17) a flavonoles (3-hidroxi flavonas; Estructura V, pág. 18) y las antocianinas (Estructura I, pág. 17). También están incluidos en los flavonoides las flavanonas (Estructura VI, pág. 18), flavonoles o dihidroxiflavonoles (Estructura VII, pág. 18) y los flavan-3,4-dioles (proantocianidinas; Estructura VIII, pág. 18). Debe notarse que hay también cinco clases de compuestos, las dihidrochalconas, 3-fenilpropiofenonas (Estructura IX, pág. 18); las chalconas (Estructura X, pág. 18; Gr. *Chalcos*, cobre); las isoflavonas, 3-fenilcromonas (Estructura XI, pág. 19); las neoflavonas, 4-

fenilcumarinas (Estructura XII, pág. 19) y las auronas, 2-benzilidina-3-cumaranonas (Estructura XIII, pág. 19; *L. aurum*, oro) los cuales realmente no poseen el esqueleto básico 2-fenilcromano (Estructura II, pág. 17), pero ambos son tan químicamente y biosintéticamente cercanos a los otros tipos de Flavonoides que siempre se incluyen en el grupo Flavonoide.

Núcleo básico de un Flavonoide

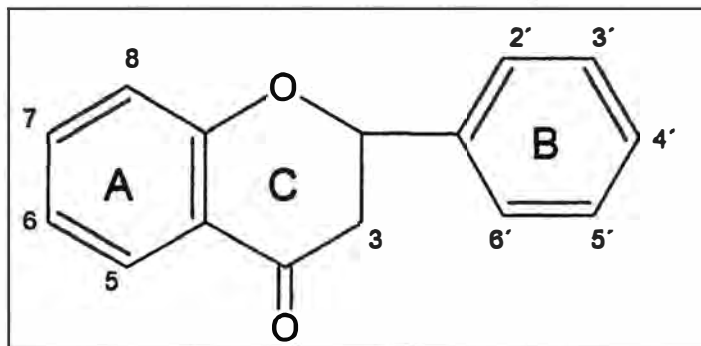


Fig. 1.11 Esqueleto de un Flavonoide

Estructura de Agliconas de Flavonoides

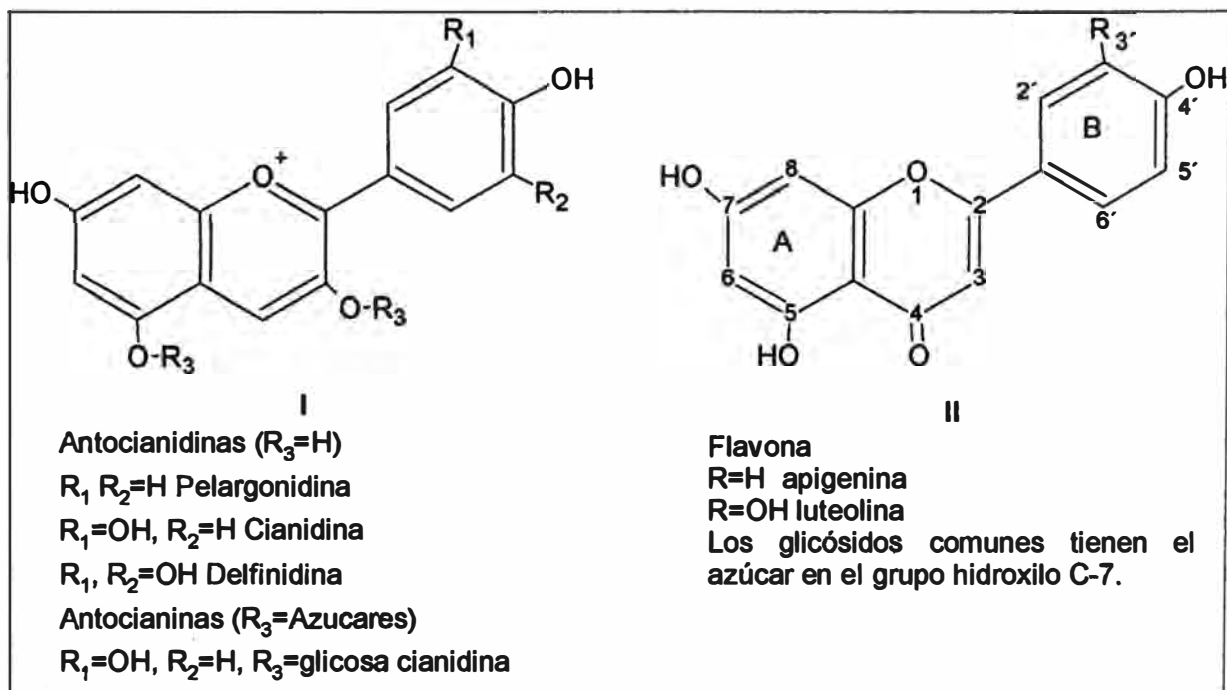


Fig. 1.12. Tipos de Estructuras de Agliconas de Flavonoides

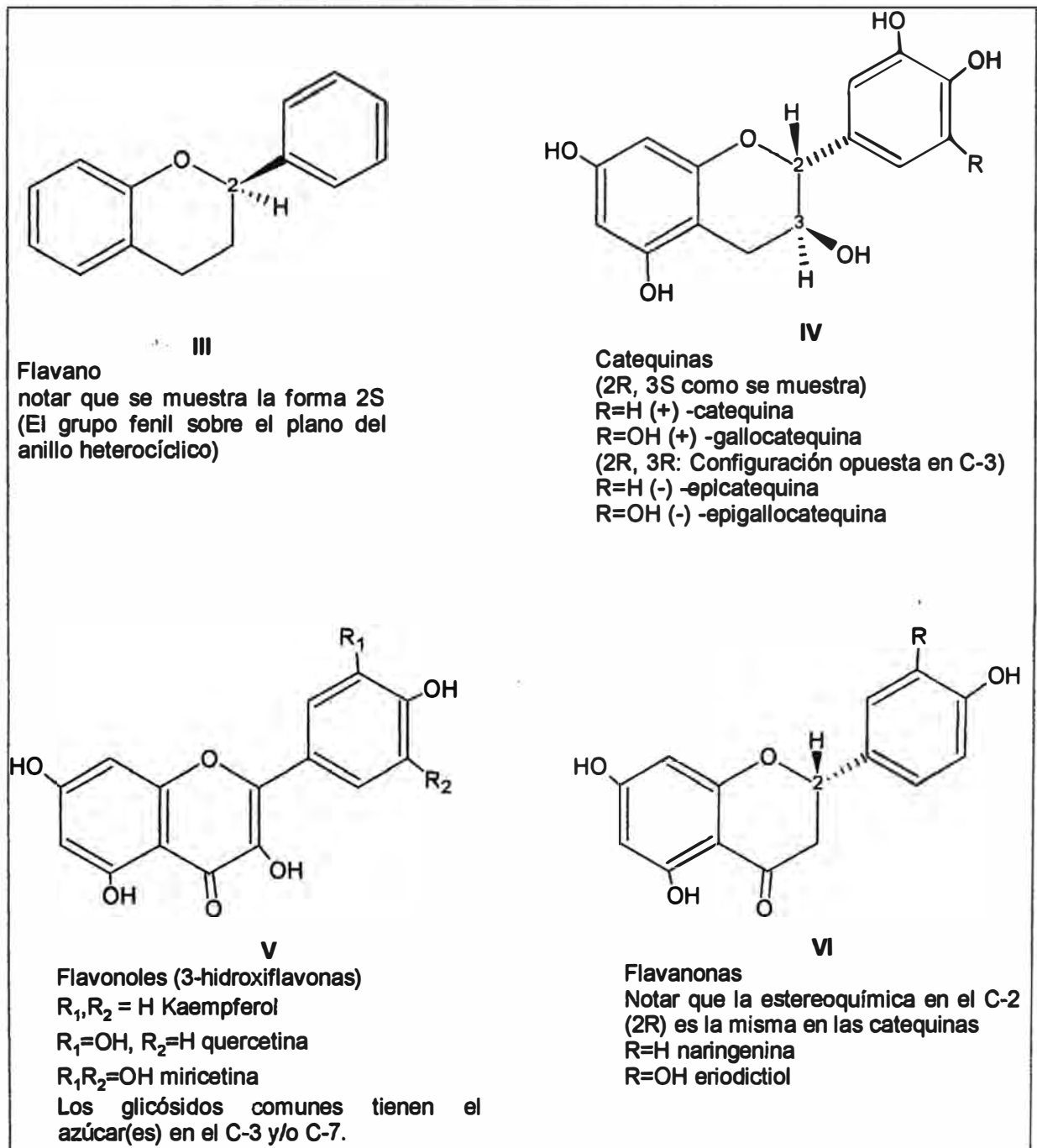


Fig. 1.12. Tipos de Estructuras de Agliconas de Flavonoides.
 (Continuación)

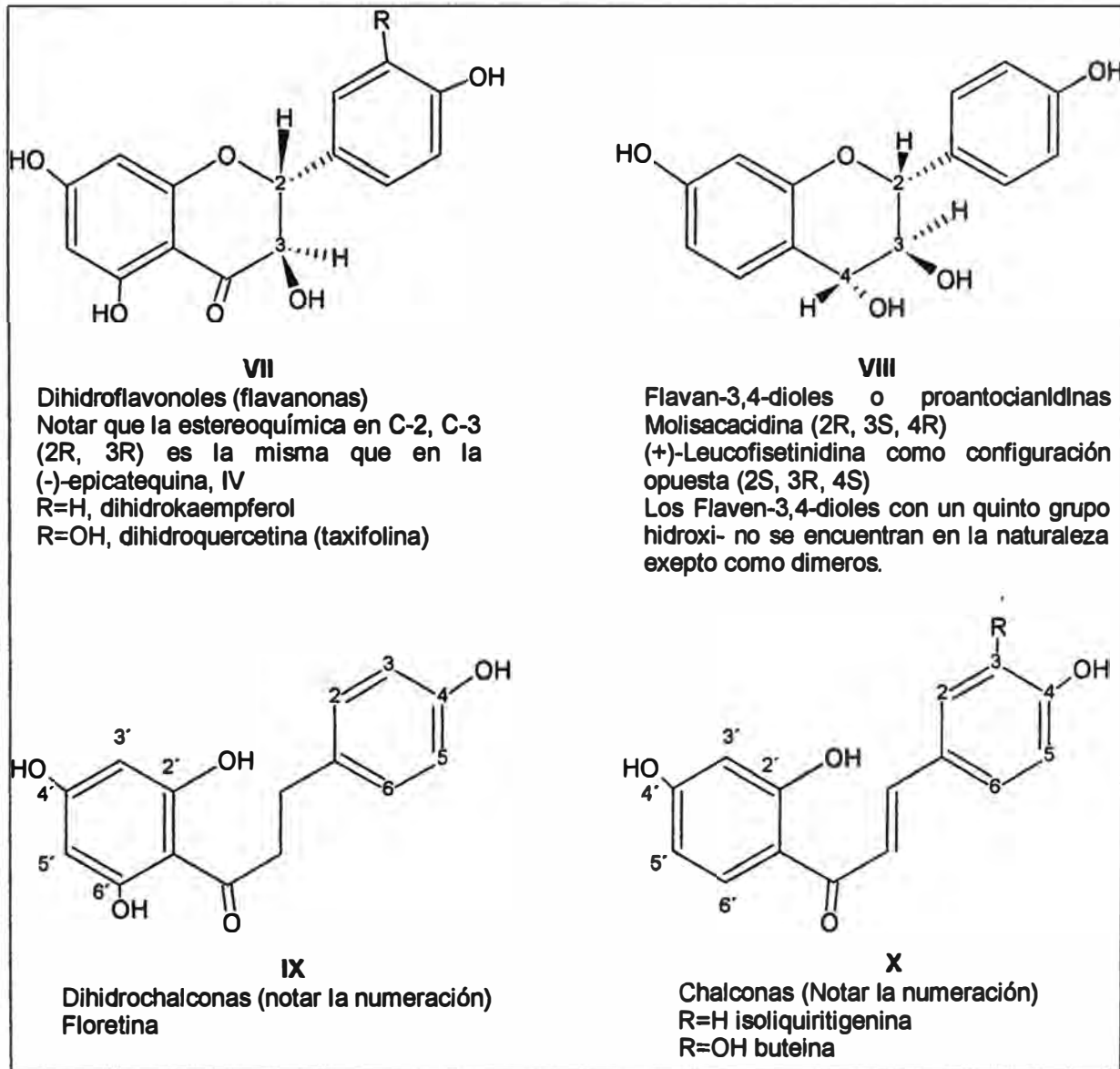


Fig. 1.12. Tipos de Estructuras de Agliconas de Flavonoides
(Continuación)

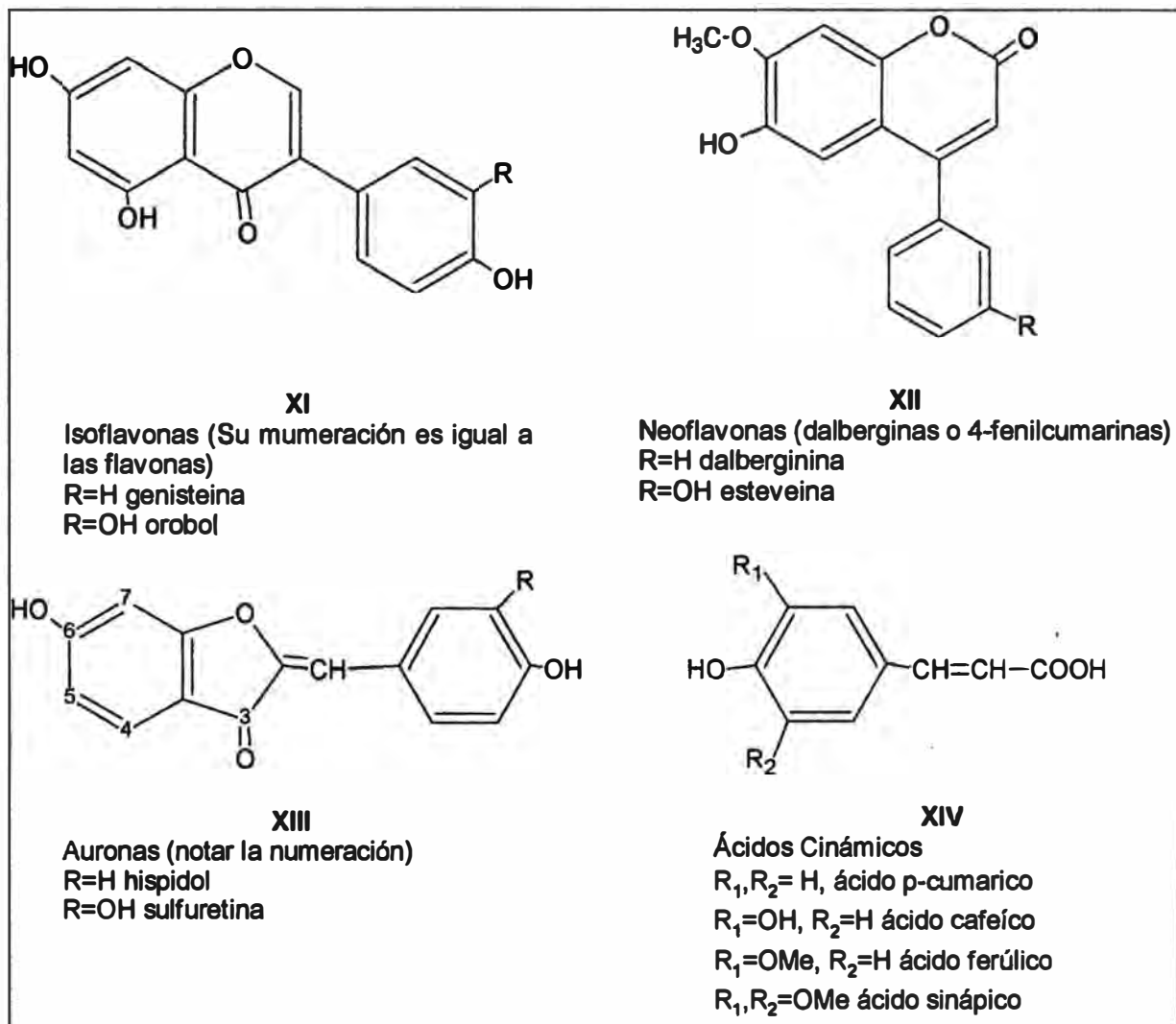


Fig. 1.12. Tipos de Estructuras de Agliconas de Flavonoides
(Continuación)

Cada una de las clases de flavonoides que se mencionaron, suelen encontrarse bajo la forma de glicósidos con una o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa; es frecuente que diferentes azúcares se hallen unidos a una misma aglicona y en diferentes posiciones lo que hace mayor el número de glicósidos conocidos.

Los flavonoides se encuentran generalmente en mezclas como agliconas y/o glicósidos; en muchos casos, debido a la complejidad de la mezcla es más frecuente el estudio de estos compuestos bajo la forma de agliconas para lo cual los extractos deben hidrolizarse previamente. Se hallan presente en todas las partes de las plantas, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo más comunes las flavonas y flavonoles y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y las auronas. Al año 1990 se conocen alrededor de 3000 flavonoides, entre ellos 450 flavonoles, 300 flavonas, 150 isoflavonas, 60 chalconas, 20 auronas, etc.

1.2.1.2 Propiedades y características espectrales de los flavonoides

Los espectros ultravioleta y visible de los flavonoides son determinados usualmente en solución metanólica. El espectro consiste de dos máximos de absorción en los rangos 240-285 nm (Pico I) y 300-550nm (Pico II). Podría indicarse como característica que en dihidroflavonas, dihidroflavonoles e isoflavonas El pico I es de baja intensidad (más baja que el Pico II). En la tabla 1.2. se dan los rangos de los valores de absorción para las BI y BII de los diferentes tipos de flavonoides. La variación de estos rangos depende del modelo de hidroxilación y del grado de sustitución de los hidroxilos.

Geissman ¹⁵ en 1952 y Markham en 1970 ³¹ reportaron la relación que existe entre los colores y la posible estructura del flavonoide. Aquellos compuestos son coloreados porque absorben luz en la región visible del espectro entre el rango de 400 y 800 nm. La luz de absorción en esta región y en el

ultravioleta (150 a 400 nm) causa excitación de los electrones en la molécula de manera que existen saltos hacia los niveles superiores, es decir saltos cortos necesitan de longitudes de onda mayores. De esa manera, hidrocarburos saturados no muestran absorción sobre los 160 nm, pero compuestos que tienen doble o triple enlace, o varios átomos con electrones no enlazantes, muestran absorción en mayores longitudes de onda.

Graebe y Liebermann ²⁰ en 1868 fueron los primeros en reconocer la relación entre color e instauración. Algunos años después Witt ⁵⁰ en 1888 asignó los términos cromóforos (Gr. Phoros, conducta) para grupos orgánicos que producían color cuando presentan en una molécula y auxócromo para otros grupos los cuales ahondaron tales colores. La relación entre instauración, la estructura de los cromóforos y los colores no llegó hacer aparente, sin embargo hasta las teorías electrónicas de la química orgánica han trabajado ampliamente sobre eso.

Ahora se reconoce generalmente que la presencia de la conjugación, cromóforos y auxócromos en una molécula, promueven grandemente la facilidad de transición electrónica a niveles de energía más altos para la estabilización de la estructura excitada resultante; en algunas moléculas dicha transición es tan grande como la cadena conjugada, o tan gran grande como el número de cromóforos y auxócromos, los más sencillos son tales transiciones, y tan grandes como la longitud de onda que absorben.

Tabla 1.2.
Valor de absorción para los Picos PI y PII de los diferentes tipos de flavonoides.

Pico I (nm)	Pico II (nm)	Tipo de flavonolde
250-280	310-350	Flavonas
250-280	330-360	Flavonoles (3-OH sustituido)
250-280	350-385	Flavonoles (3-OH libre)
245-275	310-330	Isoflavonas (5-deoxi-6,7-dioxi)
275-295	300-330	Isoflavonas, dihidroflavonoles
230-270 (baja intensidad)	340-390	Chalconas
230-270 (baja intensidad)	380-430	Auronas
270-280	465-560	Antocianidinas, antocianinas

Fuente: Olga Lock Sing, (1997).

Estos hechos están bien ilustrados en el campo de los flavonoides. Los flavanos hidrox-sustituidos (catequinas y proantocianinas), en los cuales aparece la conjugación no-hexocíclica de los dos anillos bencénicos, tiene un Pico de absorción como el de los fenoles simples con $\lambda_{\text{máx}}$ en 275-280 nm (Fig. 1.13.). Similarmente las flavanonas e isoflavonas tiene un espectro como aquellos de las correspondientes hidroxiacetofenonas, ya que aquí solo los grupos hidrox en el anillo A están en conjugación con el grupo carbonilo en C-4 (Fig. 1.14). Sin embargo, la conjugación entre los grupos hidrox del anillo B y los grupos carbonilos en el C-4 llegan a ser importantes en las flavonas, y el espectro resultante consiste de dos Picos bien separados de alta absorbitividad ($\log \epsilon > 4.0$). El único con longitud de onda más larga (Pico I) están asociados con la conjugación del anillo B y la de longitud de onda más corta (Pico II) con el anillo A (Fig. 1.15.). En compuestos

polihidroxisustituidos hay una gran concordancia en la superposición de los Picos de absorción individuales las cuales son debidas a las contribuciones echas por varias formas establecidas y muchos Picos más débiles son enmascaradas o combinadas para dar máxima extensión. En los flavonoles, el Pico I se mueve a longitudes de ondas más largas que en las flavonas debido a la contribución del grupo hidroxil-vinílico en C-3 (Fig. 1.15.). En concentración suficientemente alta, soluciones de flavonoles absorben suficientemente en la región azul del espectro visible hasta que aparecen amarillos. Las chalconas son amarillos más profundos porque absorben ligeramente longitudes de ondas más largas que los flavonoles. En las auronas, el Pico I está en una longitud de onda aún más larga probablemente por lo plano del anillo heterocíclico de cinco lados y consecuentemente de más grande facilidad de resonancia. Se puede notar, por lo tanto, que a medida que incrementa la conjugación, los flavonoides absorben luz a longitudes de onda más largas.

Finalmente debe recordarse que el espectro de todos los grupos de flavonoides son marcadamente alterados cuando los grupos hidroxil-fenólicos son ionizados (por ejemplo sobre pH 9) o relacionados con una copigmentación o en la formación de un quelato con metales.

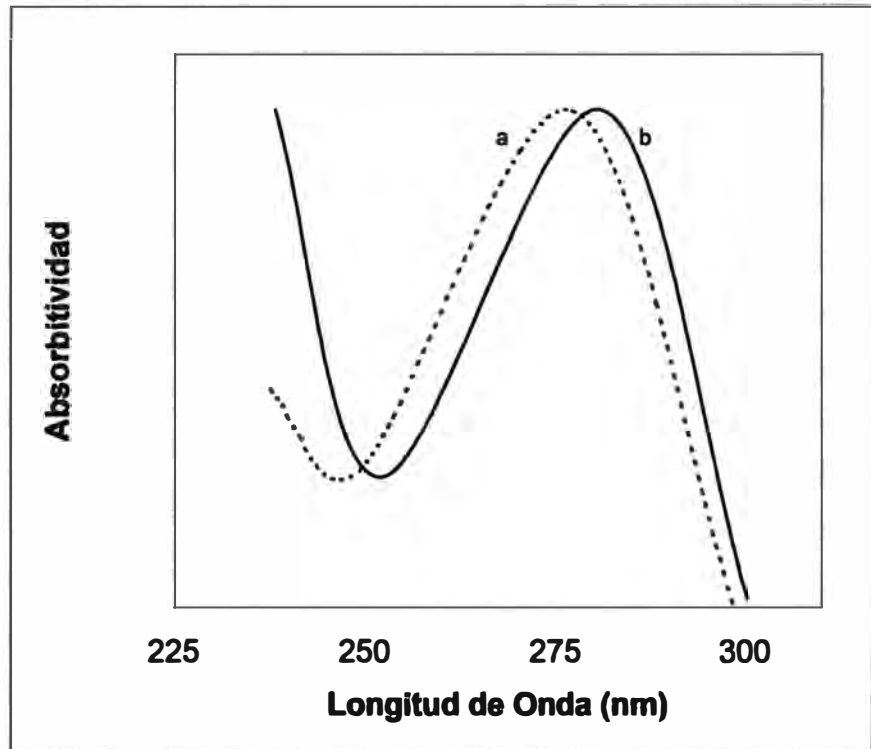


Fig. 1.11. El espectro de absorción de (a) (+)-catequina (IV) y (b) catecol (1,2-dihidroxibenceno) en etanol.

Fuente: T.W. Goodwin, (1976).

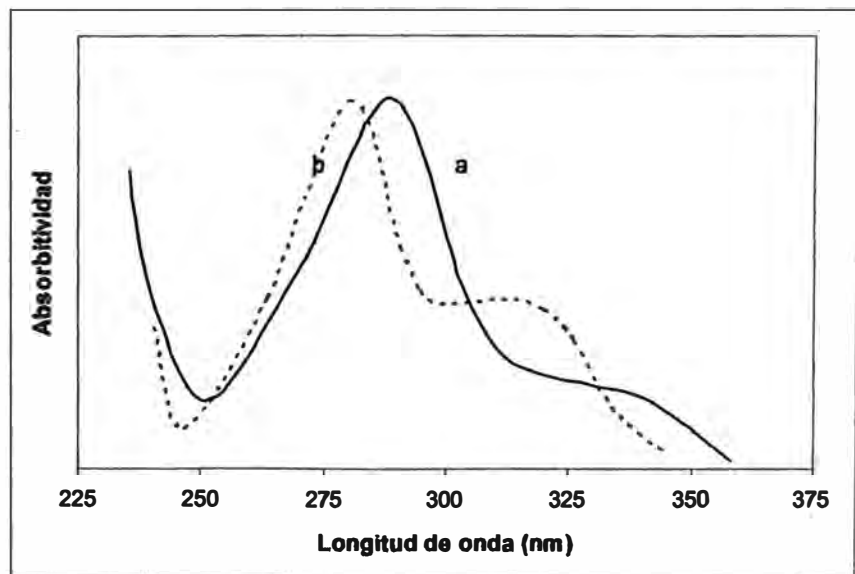


Fig. 1.12. El espectro de absorción de (a) narigenina (VI) y (b) 2,4-dihidroxi-acetofenona en etanol.

Fuente: T.W. Goodwin, (1976).

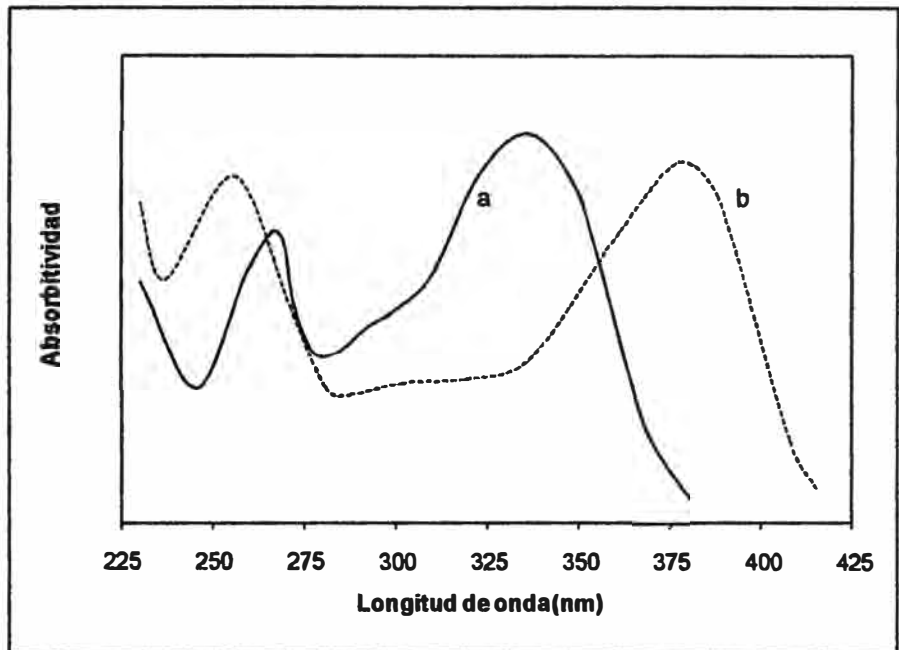


Fig. 1.15. El espectro de absorción de (a) apigenina (II) y (b) quercetina (V) en etanol.

Fuente: T.W. Goodwin, (1976).

1.2.1.3 Función de los flavonoides en las plantas.

Los pigmentos solubles en agua de los flavonoides (antocianinas, flavonoles y flavonas) son ampliamente distribuidos en la naturaleza. Las antocianinas coloreadas intensamente son las más abundantemente presentes en pétalos y frutas, pero también aparecen en hojas, raíces y tubérculos. En las hojas de muchas plantas su presencia es probablemente enmascarada por la clorofila, pero el color rojo-púrpura de la antocianina algunas veces aparece en hojas secas o frescas. Los flavonoles y las flavonas son también muy comunes constituyentes de las hojas, pero su amarillo pálido o color crema son de nuevo enmascarados por la clorofila.

La función más significativa de los flavonoides es su habilidad para impartir color en las plantas en que aparecen.

Ellos son responsables de muchos colores naranja, escarlata, carmesí, malva, violeta y azul, así también contribuyen mucho para el amarillo, marfil y flores crema. Solamente los otros grupos considerados en el tema del color en plantas superiores son las clorofilas y carotenoides lipo-solubles. Las Clorofilas α y β proveen el prevaecimiento verde de hojas, y los carotenoides son las más importantes fuentes de los colores amarillos en flores y frutos.

Los flavonoides son importantes para las plantas por los colores en las flores; que junto con la forma, fragancia y néctar de las mismas atraen abejas, mariposas y otros animales de plantas superiores para asegurar su fertilización. De hecho, muchas especies de plantas son auto-incompatibles y son así completamente dependientes de animales directores para este propósito. Aún en semillas de plantas autopolinizadas, es usualmente más alto a causa de las actividades de estos insectos, y esto explica el porque tales plantas retienen sus colores de los pétalos atractivos, aún después de generaciones de sembradas.

La asociación entre la actividad de la abeja y el color de la flor ha sido ampliamente estudiada. Las abejas pueden diferenciar cuatro colores básicos y la evolución natural de las plantas que producen colores azules deben estar asociados con la preferencia de las abejas por éste color. Por el contrario, los colibrís, los cuáles son polinizadores significantes en climas tropicales y subtropicales, son atraídos por los colores naranja brillante y rojo, y este puede ser correlacionado con la selección por antocianidinas (pelargonidina y luteolinidina) los cuales dan solo estos colores en muchas especies de plantas tropicales. El rango de directores polinizadores conocidos y sus preferencias en

términos de colores de flores están indicados en la tabla 1.3., donde los colores azul, rojo, y rosado muestran la presencia de antocianinas, los colores amarillos muestran la presencia de carotenoides (ocasionalmente flavonoles amarillos) y los colores blancos muestra la presencia de flavonas y flavonoles.

Tabla 1.3.

Directores de polinización y sus preferencias de color.

Animal	Preferencias en color de flores
Moscas	Marrón-púrpura o verde
Abejas	Azul, amarillo y ultravioleta
Polillas	Usualmente blanco o colores pálidos
Mariposas	Colores pálidos (a menudo rosado)
Colibríes	Anaranjado, rojo escarlata y brillante
Escarabajos	Blanco o colores blanquizcos
Murciélagos	Blanco

Fuente: T.W. Goodwin, (1976).

1.2.1.4 Contribución para el color de la flor.

La contribución de los flavonoides para el color de la flor y su importancia en relación con otros pigmentos son proporcionadas en la tabla 1.4. Las descripciones de estos colores son algo más extensas; para más precisión en los colores de flores individuales, se debería consultar tablas de colores. Los colores en la tabla 1.4. se refieren al de la corola o pétalo; debería ser, quizás, señalado que los flavonoides también contribuyen a la pigmentación en otras partes de las flores, sea el sépalo, pistilos, estambres y polen. También, por brevedad, se dan las antocianidinas, pero debe recordarse que los flavonoides tienen ocurrencia en las flores en forma de glicósidos. En el caso de las flores

verdes, éstas son presumiblemente pigmentadas por la clorofila; la clorofila aparece en algunas plantas, en los pétalos inmaduros, sólo desaparece en flores maduras.

Tabla 1.4.
Contribución de los flavonoides a los colores de las flores

Color	Pigmentos
Marfil y crema	Flavonas (ejemplo, apigenina) y/o flavonoles (ejemplo, quercetina)
Amarillo	(a) Carotenoide solo (b) Flavonol solo (c) Aurona sola (d) Carotenoide y flavonol o chalcona
Anaranjado	(a) Carotenoide solo (b) Pelargonidina y aurona
Escarlata	(a) Pelargonidina pura (b) Cianidina y carotenoide (c) Cianidina y flavonoide
Marrón	Cianidina en un fondo de carotenoides
Magenta o carmesí	Cianidina pura
Rosado	Peonidina pura
Violeta	Delfinidina pura
Azul	(a) Cianidina y co-pigmentos (b) Cianidina como complejos metálicos (c) Delfinidina y co-pigmentos (d) Delfinidina como complejos metálicos (e) Delfinidina en pH alcalino
Negro (negro púrpura)	Delfinidina en alta concentración

Fuente: T.W. Goodwin, (1976).

1.2.2 Antocianinas.

Unos de los colores más prominentes y atractivos en la naturaleza se deben a las antocianinas que abarcan el amplio rango del rojo, violeta y azul que aparecen en las plantas. El término "Antocianina" fue inicialmente propuesto por Marquat ³² en 1835 simplemente para señalar el

pigmento azul de los maíces, y luego se ha usado en un sentido más amplio para incluir el amplio grupo de pigmentos similares, ya que fue reconocido que los colores rojo y azul son manifestados por un tipo de compuesto simple.

Ya que la química de las antocianinas fue establecida por las investigaciones pioneras de Willstätter ⁴⁹ y su escuela (1913-1916) y además por otras sucesivas series de experimentos, han aparecido innumerables investigaciones en relación no sólo a la ocurrencia en la planta sino también a la genética y la bioquímica de este grupo de pigmentos. Los intensivos progresos en este campo han sido completamente revisados por Karrer ²⁹ en 1932, Blank ³ en 1947 y Geissman ¹⁶ en 1955. Dentro del ámbito de la química de las antocianinas, solamente unas cuantas contribuciones se han añadido desde la publicación de los reportes exhaustivos ya mencionados. Luego, la atención ha sido enfocada a los problemas de biogénesis de los grupos de pigmentos relacionados.

1.2.2.1 Hidroxilación básica de antocianidinas naturales

De acuerdo con Willstätter y Everest en 1913 ⁴⁹, las *antocianinas*, la mayoría de aquellas que aparecen disueltas en la savia de la célula de flores, frutas y otros órganos de plantas, pertenecen a un grupo de glicósidos y el resto libre de azúcar ha sido nombrado como *antocianidina*. La constitución común de todas las antocianidinas fue primero establecida por Willstätter ⁴⁹ y luego confirmada por otras extensas series de experimentos de síntesis, para definir a la 2-fenilbenzopirilio, o flavilio.

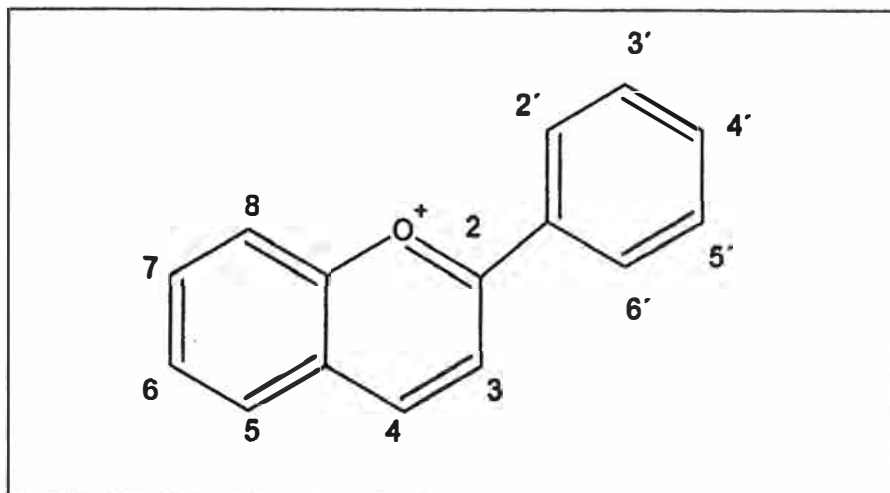


Fig. 1.16. Cati3n Flavilio

Numerosas investigaciones han mostrado despu3s que los esquemas de hidroxilaci3n en antocianidinas naturales pueden ser clasificados dentro de tres b3sicos grupos de pigmentos de la pelargonidina, cianidina y delphinidina, todos de los cuales son hidroxilados en las posiciones 3-, 5-, y 7- en com3n. Los derivados metilados son frecuentemente tambi3n encontrados en la naturaleza. Adicionalmente se ha reconocido una antocianidina especial, en la cual el esquema de hidroxilaci3n prueba ser id3ntica con la de la flavona hidroxilada, Apigenina.

Antocianidinas

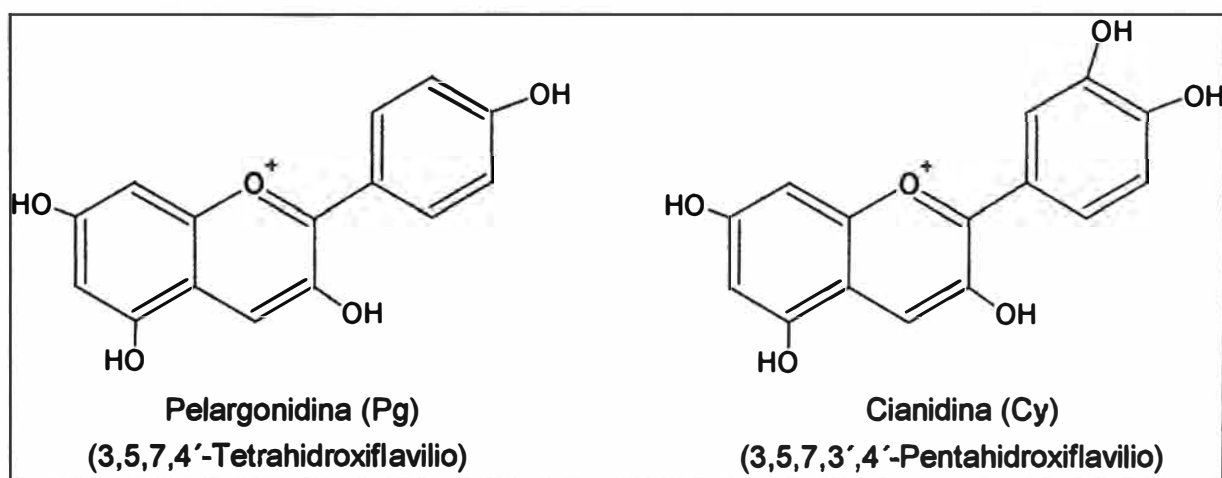


Fig. 1.17. Tipos de Antocianidinas

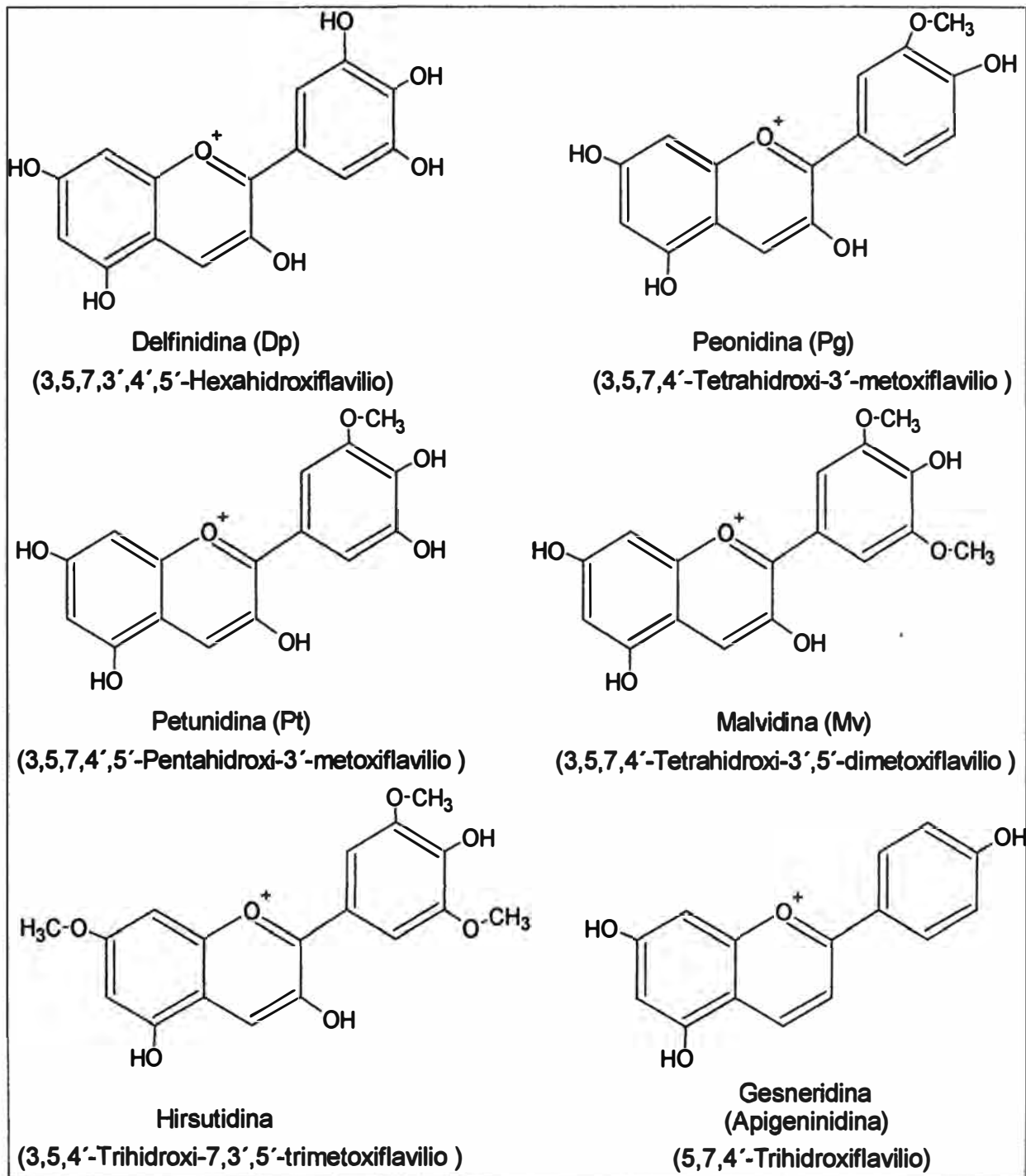


Fig. 1.17. Tipos de Antocianidinas (Continuación)

1.2.2.2 Caracterización de varios tipos de glicosidación y acilación.

Un gran número de investigaciones en los colores más vivos y bellos de la naturaleza, han demostrado que los pigmentos generalmente ocurren como antocianinas, ejemplo, los glicósidos de las antocianidinas contienen uno o más restos azúcares y ocasionalmente varios otros restos de ácidos orgánicos. Debido a su solubilidad en agua, las antocianinas aparecen en el tejido de la planta, comúnmente disueltas en la savia de la célula; contando con ello pueden ser relacionados en un grupo de "Pigmentos Quimocrómicos".

Como una regla, las antocianinas se separan en antocianidinas y sus respectivos componentes azúcares por ebullición en 20 % de ácido clorhídrico, por tres minutos. Los azúcares que han sido frecuentemente encontrados en antocianinas naturales son glucosa, ramnosa, galactosa y gentobiosa; la xilosa está presente en algunos casos. El ataque químico a los azúcares es encontrado en la mayoría de los casos que es en la posición 3 y menos frecuente en la posición 5 de las antocianinas.

La determinación de la estructura del glicósido ha sido posible por la comparación cuidadosa de glicósidos naturales con varias metoxi-antocianidinas sintéticas principalmente en reacciones de los colores en soluciones buffers estandarizadas y pruebas de oxidación. Tales estudios dirigen hacia la clasificación siguiente de las antocianinas naturales:

- a) 3-monósidos, incluyendo 3-glucósidos, -galactósidos y -pentósidos.

- b) 3-biósidos, incluyendo 3, diglucósidos, ramnoglucósidos y -xiloglucósidos.
- c) 3:5-dimonósidos, incluyendo solo 3:5-diglucósidos.
- d) Antocianinas complejas o aciladas, incluyendo derivados acilados de biósidos, en los cuales los ácidos orgánicos tales como p-hidroxibenzoico, malónico, p-cumárico y sinápico son involucrados en combinación éster con una de las antocianidinas o grupos hidróxilos de azúcar.

La diferencia entre estas clases de glicósidos puede, aproximadamente, ser determinada por pruebas de separación de antocianinas entre dos solventes inmiscibles. El número de distribución, es decir, la proporción de antocianinas extraídas con alcohol isoamílico del agua en un volumen de 0.5% de ácido Clorhídrico acuoso (como ejemplo, 10 mg de glucósidos en 50 mL de ácido) puede ser usado en prácticas. De ésta manera, grupos individuales de pigmentos pueden ser diferenciados con los valores de la tabla 1.5, que muestra los valores del coeficiente de distribución de una extracción líquido-líquido con alcohol isoamílico, como herramienta para distinguir varios tipos de antocianinas glicosidadas y aciladas.

Tabla 1.5.
Valores del coeficiente de distribución.

Tipo de Pigmento	Rango del número de distribución (Alcohol isoamílico con 0.5 % de HCl) encontrados en antocianinas naturales
3,5-dihexósidos	1-3
3-Ramnoglucósidos } 3-Xiloglucósidos }	6-9
3-Monohexósidos } Glicósidos acilados }	9-20
No glucósidos (antocianidinas)	100

Fuente: Kozo Hayashi (1962).

La solubilidad de las antocianinas diglicosídicas en alcohol isoamílico es generalmente muy pequeña y el número de distribución algunas veces varía con la concentración del pigmento, probablemente debido a auto-asociación de los pigmentos en ácidos acuosos. Se encontró que la relación de distribución entre n-butanol y 0.5% de ácido Clorhídrico es más preciso que el número de partición mencionado antes para diferenciar entre las antocianinas diglicosidas individuales (tabla 1.6). En alguna relación, la prueba de partición es más conveniente por la diferenciación sugerida de la estructura en casos donde la mayor variación consiste en el componente azúcar. Debería ser tomado en cuenta que una saponificación preliminar en antocianinas aciladas con 10 % de hidróxido de sodio se requiere previamente para aplicar una efectiva prueba de distribución.

Para una posterior caracterización individual de antocianinas, deben ser usados la comparación cuidadosa

de propiedades físicas como cristalización, solubilidad, espectro de absorción, fluorescencia y colores en soluciones buffer de un pH determinado. Entre estas propiedades el espectro de absorción es, probablemente el más importante, porque está directamente conectada con la apariencia visual de las flores.

El primer factor controlado en el color de las antocianinas reside en grupos hidroxílicos ligados a los núcleos de flavilio, especialmente están ligados al grupo 2-fenil en la molécula. En general, la intensidad del color visible es provocado por un incremento en el número de hidroxilos, como se muestra para los derivados de la pelargonidina naranja-rojo, cianidina rojo oscuro y la delphinidina rojo-azulado. La sustitución metil parece afectar el color de la antocianina para darle más o menos un tono azulado bajo, como en los glicósidos de la peonidina y la malvidina.

Los colores de las antocianinas y las antocianidinas también son sometidos a cambios notables con sales inorgánicas y alcalinas, en medio del cual las sales de hierro son más importantes. Además, la pelargonidina, peonidina, malvidina, hirsutidina y sus glicósidos, que tienen solamente un grupo hidroxilo libre unido al anillo bencénico, no reaccionan con iones hierro y consecuentemente no dan ningún cambio de color. Estos comportamientos pueden ser usados para preparar una diferenciación de los esquemas de hidroxilación en antocianinas extraídas de plantas. Las pruebas de color con sales de hierro deberían naturalmente ser llevadas bajo condiciones neutras. Algunas propiedades típicas importantes de antocianinas están en la tabla 1.6.

Tabla 1.6.

Algunas propiedades importantes de antocianinas usadas para propósitos de identificación

	Estructura	Cloruro	Picrato	Número de distribución		Max. Absorción (m μ)		Reacción con cloruro férrico
				AmOH- 0.5% HCl	BuOH- 0.5% HCl	MeOH- HCl	EtOH- HCl	
Derivados de pelargonidina								
Callisteina	3- β -glucósido	Cabellos delgados, agujas anaranjado-rojo	Rojo brillante, platos rectangulares	32.0		506		Ninguno
Pelargonidina	3,5-di- β -glucósido	Cabellos delgados, agujas carmín-rojo			20.0	504	511	Ninguno
Derivados de cianidina								
Crisantemina (=asterina)	3- β -glucósido	Purpúreo-rojo, hoja rómbica	Prisma rojo o aguja prismática	19.0			525	Azul
Idaeina	3- β -galactósido	Parduzco-rojo, agujas prismática	Agujas rojas	14.9				Azul
Cianina	3,5-di- β -glucósido	Parduzco-rojo, placas rómbicas	Aguja roja fina (fácilmente soluble)	1.8	14.8	522	528	Azul
Mekocianina	3-gentiobiósido	Agujas rojas	(fácilmente soluble)		16.7			Azul

Fuente: Kozo Hayashi (1962).

Tabla 1.6. (Continuación)

Algunas propiedades importantes de antocianinas usadas para propósitos de identificación

	Estructura	Cloruro	Picrato	Número de distribución		Max. Absorción (m μ)		Reacción con cloruro férrico
				AmOH-0.5% HCl	BuOH-0.5% HCl	MeOH-HCl	EtOH-HCl	
Keracianina	3-ramnoglicósido	Parduzco-rojo, agujas prismáticas	(fácilmente soluble)	6.8				Azul
Derivados de Peonidina								
Oxiccocianina	3- β -glucósido	Violeta oscuro-rojo, agujas prismáticas	Marrón rojizo, agujas en forma de tablón	13-18		523		Ninguno
Peonina	3,5-di- β -glucósido	Agujas parduzco-rojo	Agujas rojo-marrón	17.1		523	527	Ninguno
Derivados de la Delfinidina								
Empetrina	3- β -galactósido	Rojo-marrón, hojas en forma de barril	Agujas carmín-rojo	7.5-8.0				Azul
Delfina	3,5-di- β -glucósido	Rojizo-violeta, plaquetas			12.0	534	541	Azul
Delfinina	Ester de delfinina p-hidroxibenzoico	Parduzco Profundo-rojo, placa de prisma	Marrón-rojo, flocula precipitada.					Azul

Fuente: Kozo Hayashi (1962).

Tabla 1.6. (Continuación)
Algunas propiedades importantes de antocianinas usadas para propósitos de identificación

	Estructura	Cloruro	Picrato	Número de distribución		Max. Absorción (m μ)		Reacción con cloruro férrico
				AmOH-0.5% HCl	BuOH-0.5% HCl	MeOH-HCl	EtOH-HCl	
Violanina	Ester de 3-ramnoglucósido p-hidroxicinnamico	Azul-violeta, en seis lados de la placa del tetraedro	Agujas cereza fina-rojo					Azul
Derivados de la petunidina								
Petunina	3,5-di- β -glucósido	Violeta, placas rectangulares largas o prismas	(fácilmente soluble)		13.6	533		Azul
Derivados de la malvidina								
Oenina (=ciciamina)	3- β -glucósido	Prisma rojo profundo	Agujas carmín-rojo	10.4 (10.1)		535		Ninguno
Uliginosina	3- β -galactósido	Rojo-purpúreo, lanudos cristales rojos	Agujas carmín-rojo	10.2				Ninguno

Fuente: Kozo Hayashi (1962).

Tabla 1.6. (Continuación)

Algunas propiedades importantes de antocianinas usadas para propósitos de identificación

	Estructura	Cloruro	Picrato	Número de distribución		Max. Absorción (m μ)		Reacción con cloruro férrico
				AmOH- 0.5% HCl	BuOH- 0.5% HCl	MeOH -HCl	EtOH- HCl	
Malvina	3,5-di- β -glucósido	Rojizo-violeta, agujas prismáticas	Pelo fino, agujas cereza-roja	1.6	10.4 (11.6)	533	537	Ninguno
Ensatina	Ester de 3-diglucósido p-hidroxicinámico	Cristales granates	Rojo, agujas delgadas	8.8			(555)	Ninguno
Derivados de la Hirsutidina								
Hirsutina	3,5-di- β -glucósido	Agujas marrón profundo - rojo			11.3			Ninguno

Fuente: Kozo Hayashi (1962).

1.2.2.3 Efectos del cambio de pH.

Las antocianinas son notoriamente inestables bajo condiciones neutras o básicas. El efecto del incremento del pH en la estructura de la antocianina fue por primera vez investigado en los años sesenta por Jurd ²⁷ en 1962, Timberlake-Bridle ⁴⁸ en 1980 y Harper-Chandler ²² en 1967; pero no fue sino hasta el trabajo de Brouillard⁵, en los setentas, que las transformaciones estructurales involucradas en incrementos de pH en una solución de antocianina fueron finalmente aclaradas, usando técnicas de cambio de pH.

Por debajo de pH=2 la antocianina existe sobre todo en la forma del catión flavilio (AH^+) roja ($R_1=O$ -azúcar) o amarillo ($R_1=H$). A medida que el pH se incrementa se libera un protón para pasar del rojo al quinoide azul formando A (Fig 1.18.). La forma quinoideal usualmente existe como una mezcla a medida que los grupos 4',7-OH y (si estuviera presente) 5-OH de pK_a son muy similares. Además una reacción adicional aparece, que es la hidrogenación del catión flavilio para dar el cromenol incoloro B. Este está en equilibrio con la chalcona C, el cual es también incoloro.

La estructura alternativa, también considerada para el cromenol que sufre un ataque por el agua en la posición 4 es el crom-2-ene-4-ol.

Las cantidades relativas de catión (AH^+), el quinoide (A), el cromenol (B) y la chalcona (C) en equilibrio varían con los pHs así como la estructura de la antocianina. Para las antocianinas comunes 3-O-glicósidos o 3,5-di-O-glicósidos, el producto principal formado cuando el pH aumenta a más de tres es el cromenol incoloro (B) como se muestra en la figura 1.19. para el malvidin-3-glucósido.

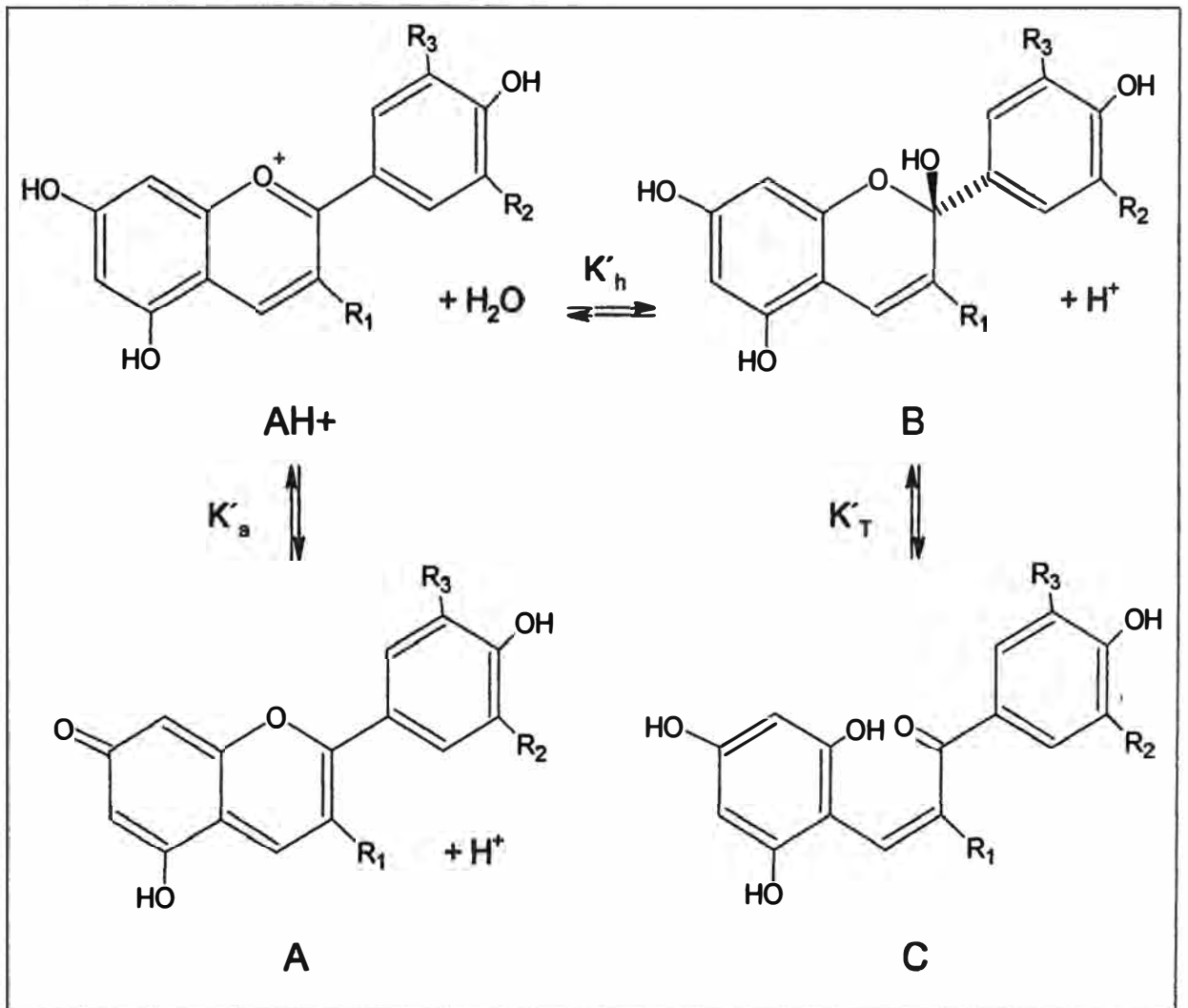


Fig. 1.18. Efecto del pH.

Fuente: Guillermo A. Iacobucci y James G. Sweeny, (1983).

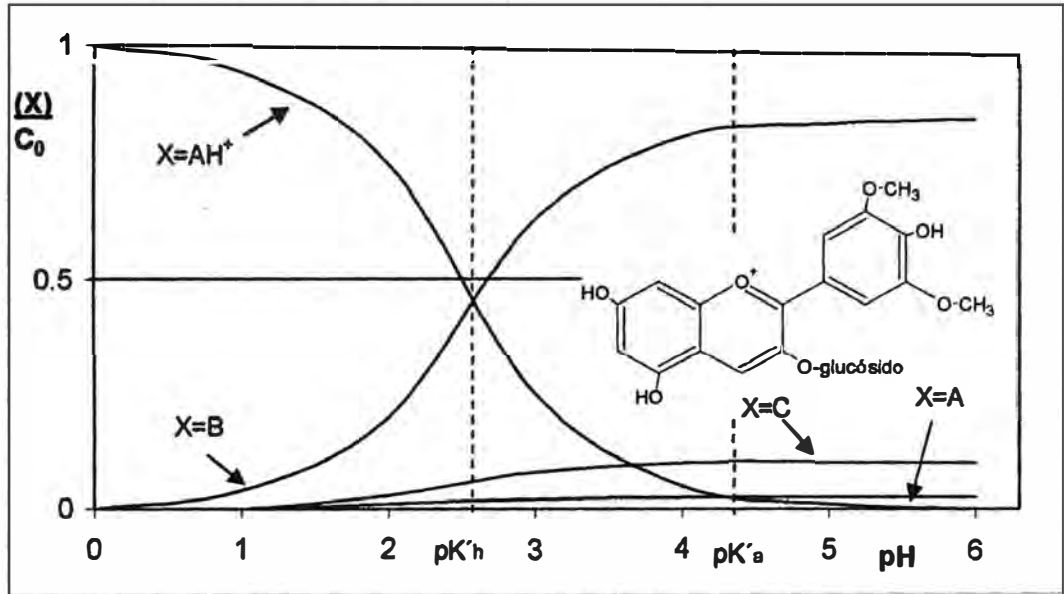


Fig. 1.19. Distribución de equilibrio de AH^+ , A, B, y C para la malvidin-3-glucósido en función del pH.

Fuente: Guillermo A. Iacobucci y James G. Sweeny, (1983).

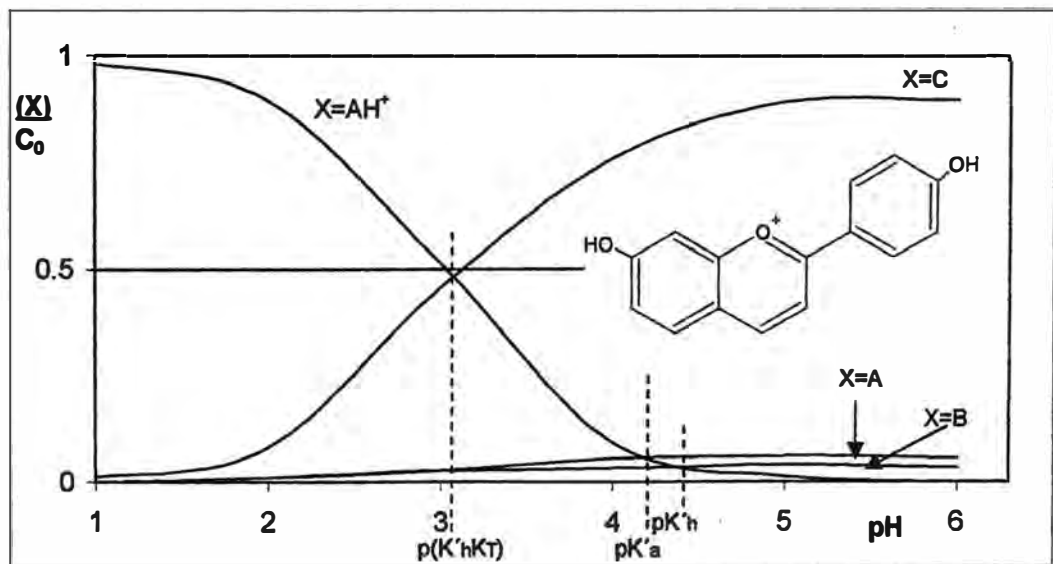


Fig. 1.20. Distribución de equilibrio de AH^+ , A, B, y C para la forma cloruro de 4',7-dihydroxiflavilio como una función de pH.

Fuente: Guillermo A. Iacobucci y James G. Sweeny, (1983).

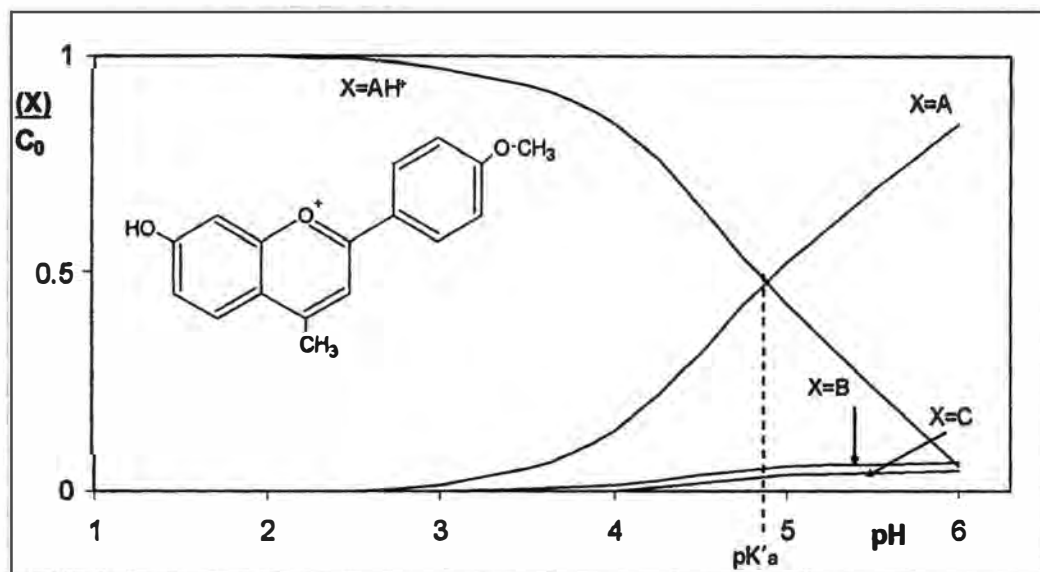


Fig. 1.21. Distribución de equilibrio de AH^+ , A, B, y C para la forma cloruro de 4'-metóxi-4-metil-7-hidroxi-flavilio como una función de pH. **Fuente:** Guillermo A. Iacobucci y James G. Sweeny, (1983).

Variando el modelo de sustitución del anillo flavilio, las antocianinas las cuales existen en la forma quinoidal A o la forma de chalcona C pueden ser preparadas. Esto es ejemplificado para el cloruro de 4',7-dihidroxi-flavilio (Fig. 1.20.) el cual forma la chalcona a pHs mayores a tres y cloruro de 4-metil-7-hidroxi-4'-metoxiflavilio (Fig. 1.21.) el cual existe como el isómero quinoidal a pHs mayores que 5. Por supuesto, que muchas sales de flavilio pueden formar mezclas de la forma quinoide, chalcona, y cromenol como se muestra para el cloruro de 4', 5, 7-trihidroxi-flavilio (apigeninidina), figura 1.22. McClelland y McGall en 1982 (21) han mostrado que el cloruro de 4'-hidroxi-flavilio también existe como una mezcla a base de cromenol, chalcona y quinoidal a pH=7.

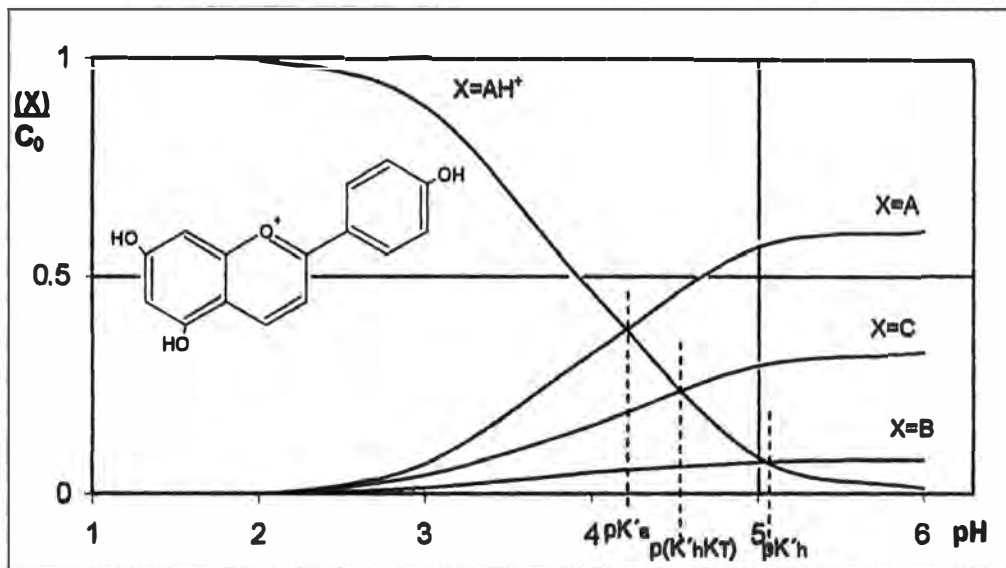


Fig. 1.22. Distribución de equilibrio de AH⁺, A, B, y C para la forma cloruro de apigeninidina como una función de pH.

Fuente: Guillermo A. Iacobucci y James G. Sweeny, (1983).

Durante su estudio cinético, Brouillard ⁵ también encontró que cada una de las reacciones mostradas en la figura 1.18. eran endotérmicas. Sobre una solución de antocianinas, por lo tanto el equilibrio es conducido a través de la forma chalcona C y aparece un descenso del color como resultado. El enfriamiento revertirá el cambio, aunque cuanto más se pase de una hora puede requerirse el restablecimiento del equilibrio. Este tiempo de retraso para reversión de la chalcona a la forma antocianina a sido aprovechado por Preston y Timberlake ⁴¹ en 1981 para aislar la chalcona de la malvidin-3-glucósido y la chalcona de la malvidin -3,5-diglucósido por cromatografía líquida a alta presión de una solución rápidamente enfriada de antocianina.

1.2.2.4 Efectos de la estructura en la estabilidad del color de las antocianinas.

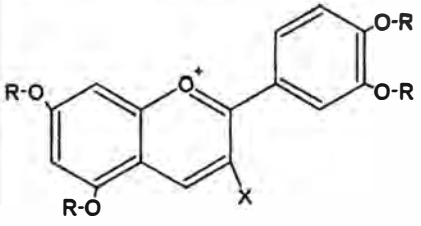
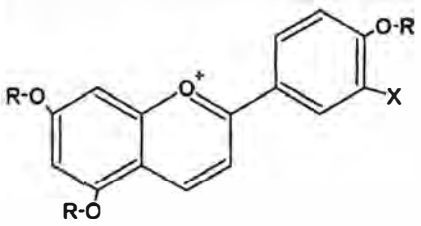
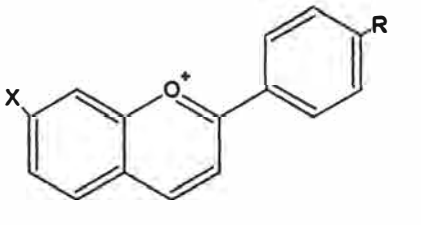
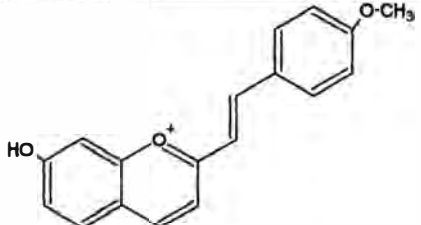
Asumiendo que una antocianina es mantenida a un pH ácido adecuado (2-3), debería ser muy estable a la temperatura ambiente. El tiempo de vida media de una antocianina típica, cianidin-3-rutinosido, es alrededor de 65 días a la temperatura ambiente en ácido cítrico 0.01M, pH 2.8. La correspondiente antocianidina libre, cianidina, sin embargo, tiene un tiempo de vida de sólo 12 horas. La lenta hidrólisis de las unidades 3-O-azúcar de antocianinas bajo condiciones ácidas es probablemente responsable, por lo tanto, por el largo plazo de degradación de estos pigmentos. Los intentos por mejorar la estabilidad por metilación de grupos hidroxílicos fenólicos libres tuvieron el efecto opuesto. (Tabla 1.7).

En un estudio relacionado a la estabilidad de 4 antocianinas y 13 3- deoxiantocianidinas sintéticas, Otha³⁸ y colaboradores en 1980 (24), encontraron que la peonidina y la malvidina son mucho menos estables que sus correspondientes 3-glucosidos a pH 2.5 y 4.5, los resultados de este estudio condujeron a dos conclusiones: (a) la presencia de un grupo 7- OH mejoró considerablemente la estabilidad y (b) la adición de grupos OH en el anillo B disminuye la estabilidad. Otros estudios con 3-deoxiantocianidinas sintéticas se adjuntan en la tabla 1.6. De esta tabla es evidente que la presencia de 4'-OH o un 7-OH le da estabilidad mientras que la metilación de estos hidroxilos la disminuye. La introducción de un grupo vinil entre C-2 y el anillo B que le otorga un tono rojo a la 3'-deoxiantocianidina también resulta en una pérdida de estabilidad. Interesantemente, de todas las sales de

flavilio sintéticas probadas, la apigeninidina que ocurre naturalmente mostró la mayor estabilidad.

Tabla 1.7.

Efectos de la estructura sobre la vida media (T) de los colores del flavilio, medido en su λ_{\max} en 0.01M de ácido cítrico, pH 2.8 a temperatura ambiente.

Estructura	X	R	T(días)	λ_{\max} (nm)
	OH	CH ₃	0.04	512
	OH	H	0.50	512
	OCH ₃	CH ₃	6	512
	O-Rutinososa	CH ₃	13	512
	O-Rutinososa	H	65	512
	OCH ₃	CH ₃	170	488
	H	H	400	475
	OH	OH	400	458
	H	OH	400	436
	H	OCH ₃	35	437
	OH	H	300	428
	OCH ₃	H	8	427
			50	506

Fuente: Guillermo A. Iacobucci y James G. Sweeny, (1983).

La naturaleza de los productos formados durante un largo tiempo de puesta en solución, permanecen aún

desconocidas. Los estudios cinéticos han mostrado que la reacción es de primer orden con respecto a la antocianina en el rango de pH 2.5 a 4.5 los más probables mecanismos de reacción involucrarían (a) hidrólisis de la antocianina a antocianidina (libres 3-OH), el cual podría ser hidrolíticamente dissociado hasta la función α , β -diceto, y (b) la reacción con oxígeno para dar productos degradados o productos fenólicos. La oxidación fenólica como un posible mecanismo es además compatible por la aceleración de descomposición con el incremento de pH y el pardeamiento general, usualmente observado.

En mezclas fenólicas complejas como vinos, la condensación con taninos pueden también proceder en extractos de antocianinas en estos materiales. En el vino rojo, por ejemplo, el peso molecular de la fracción coloreada aumenta lentamente con el tiempo debido a la reacción de condensación antocianina-tanino.

Un método sugerido para incrementar la estabilidad de antocianidinas involucra sustitución de la posición-4 con un grupo fenil o metil. Aunque estos componentes muestran mejor resistencia al decoloramiento en la presencia de SO₂ o ácido ascórbico, su comportamiento en soluciones acuosas es similar al de los compuestos iniciales 4-nosustituídos.

La sustitución de un grupo carboxi a la posición 4- también da un compuesto cuya estabilidad a pH 2.8 es similar a la de la apegininidina. La antocianidin 4-carboxi hace, sin embargo, posible la propiedad interesante de su estabilidad a pH neutro.

1.2.2.5 Reacciones de oxidación.

A.- Reacciones con ácido ascórbico/O₂.

Las antocianinas son ampliamente conocidas por ser particularmente inestables en presencia de ácido ascórbico. El rol del O₂ en ésta reacción fue reconocida y explicada en las bases de las propiedades auto-oxidativas del ácido ascórbico. La importancia del O₂ fue además indicado por el efecto inhibitor en el decoloramiento de las antocianinas por antioxidantes fenólicos como la quercetina. Posteriores observaciones han afirmado el rol esencial del O₂ en el decoloramiento de antocianidinas por ácido ascórbico. Luego de una evacuación del aire, mediante desplazamientos con argón, el ácido ascórbico fue incapaz de decolorar la apigeninidina después de 10 días de expuesto, pero lo hizo en unas cuantas horas después de admitir al aire en el sistema. Tal decoloramiento es el resultado de una desunión oxidativa del anillo pirilio de la apigeninidina que fue evidenciado por la caracterización GC/MS de floroglucinol, hidroquinona y ácido p-hidroxibenzoico como productos de degradación. Las sugerencias de que el ataque directo del ácido ascórbico en el catión flavilio fuese el responsable de la pérdida del color puede ser descartado. De hecho, el bloqueo de la función auto-oxidable ene-diol de ascorbato por metilación o acilación, como el caso de los derivados del 3-O-metil y 2-O-isovaleril mostrados en la figura 1.23. suprimió la decoloración de la apigeninidina en la presencia de aire. Esta observación condujo al desarrollo de preparaciones ricas en antocianinas de color más estable conteniendo ácido ascórbico 2-O-fosfato como fuente de vitamina C. En la figura 1.23 se muestra la

decoloración del cloruro de apigeninidina por ácido ascórbico (500 ppm) y por concentraciones equivalentes de 3-O-metil-ácido ascórbico y 2-O-isovaleril-ácido ascórbico en ácido cítrico 0.01 M (pH 2.8) saturado con aire a temperatura de sala; y el % de hidrólisis de 2-O-isovaleril-ácido ascórbico según se corrió en HPLC.

La naturaleza exacta de las actividades de las especies de oxígeno responsables por el decoloramiento es aún objeto de investigación. Se sabe, sin embargo, que la auto-oxidación del ácido ascórbico produce peróxido de hidrógeno y ácido dehidroascórbico. La intermediación del radical perhidróxilo "HOO" se ha demostrado pero no se está seguro si estas especies causan el decoloramiento o si reaccionan además con H_2O_2 (la reacción Haber-Weiss) para dar HO^\cdot como el reactivo intermedio. Apoyado por el último mecanismo lleva a buscar que un rango similar de productos de oxidación son formados del tratamiento de cloruro de apigeninidina con el reactivo fenton (una clásica fuente de OH^\cdot) cuando comparó a aquellos obtenidos con ácido ascórbico-oxígeno.

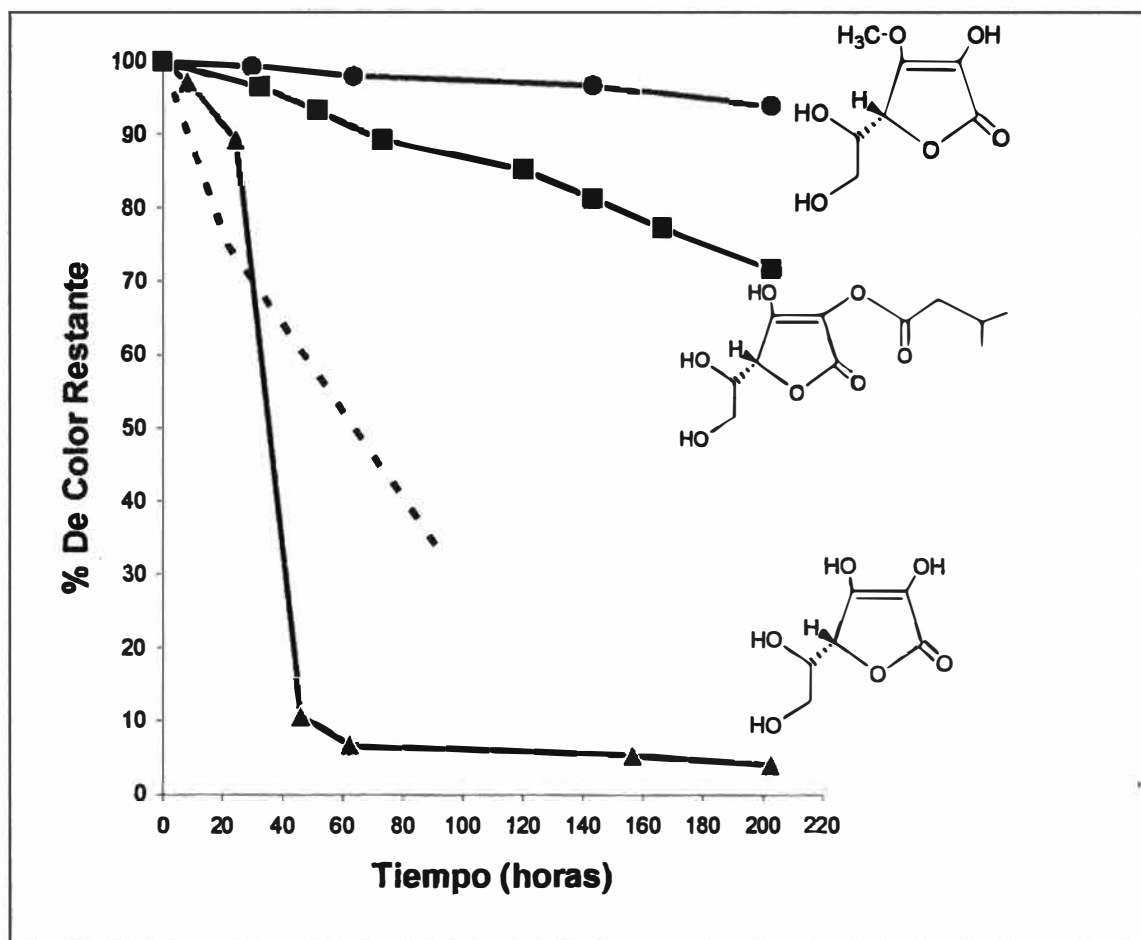


Fig. 1.23. Decoloración del cloruro de apigeninidina por ácido ascórbico (- ▲ -), 3-O-metil ácido ascórbico (- ◆ -) y 2-O-isovaleril ácido ascórbico (- ■ -). (-----) % Hidrólisis de 2-O-isovaleril ácido.

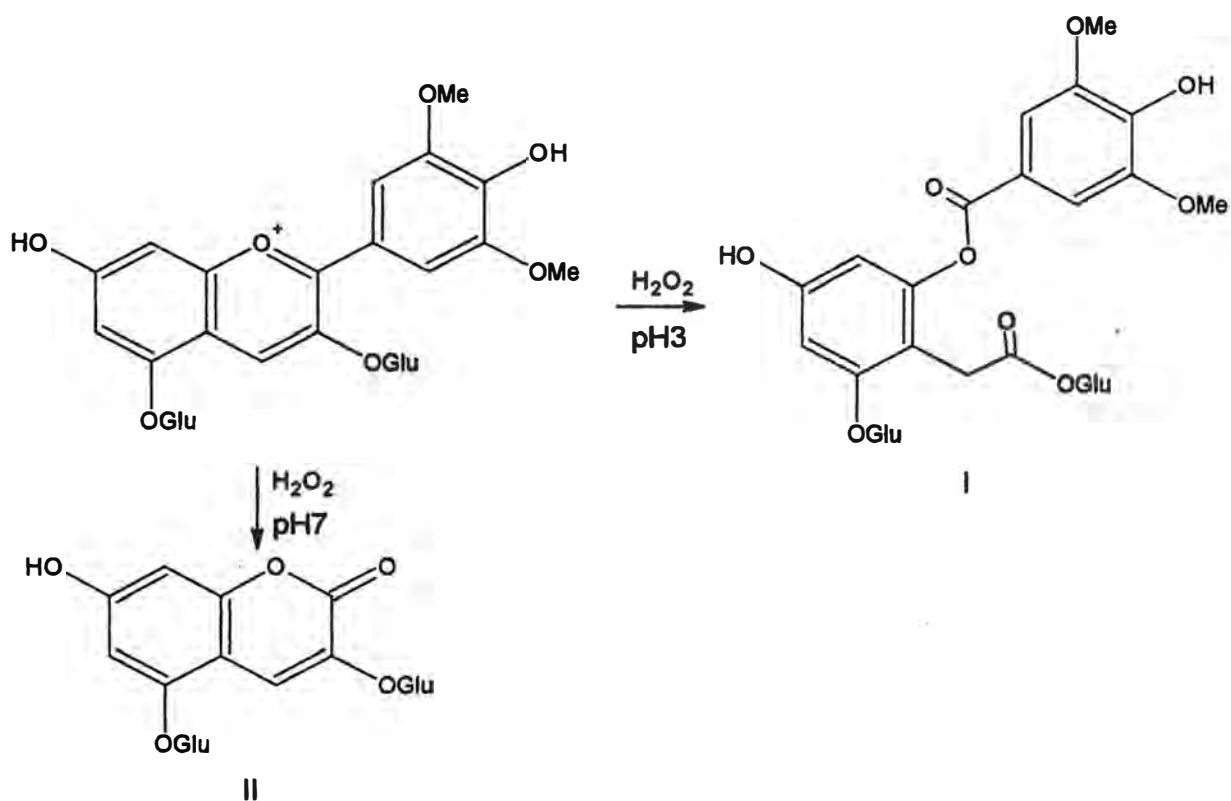
Fuente: Guillermo A. Iacobucci y James G. Sweeny, (1983).

B.-Reacciones con peróxido de hidrógeno.

La reacción de antocianinas con H_2O_2 fue investigado por primera vez por Karrer²⁹ quién encontró que la malvina reacciona para dar malvona (estructura I, página 42). En la malvona un resto de azúcar está unido como un éster y puede ser fácilmente removido por NH_4OH ; la unidad de azúcar del C-5 requiere de hidrólisis ácida para removerlo. La oxidación con Peróxido de Hidrógeno, por lo tanto, ha

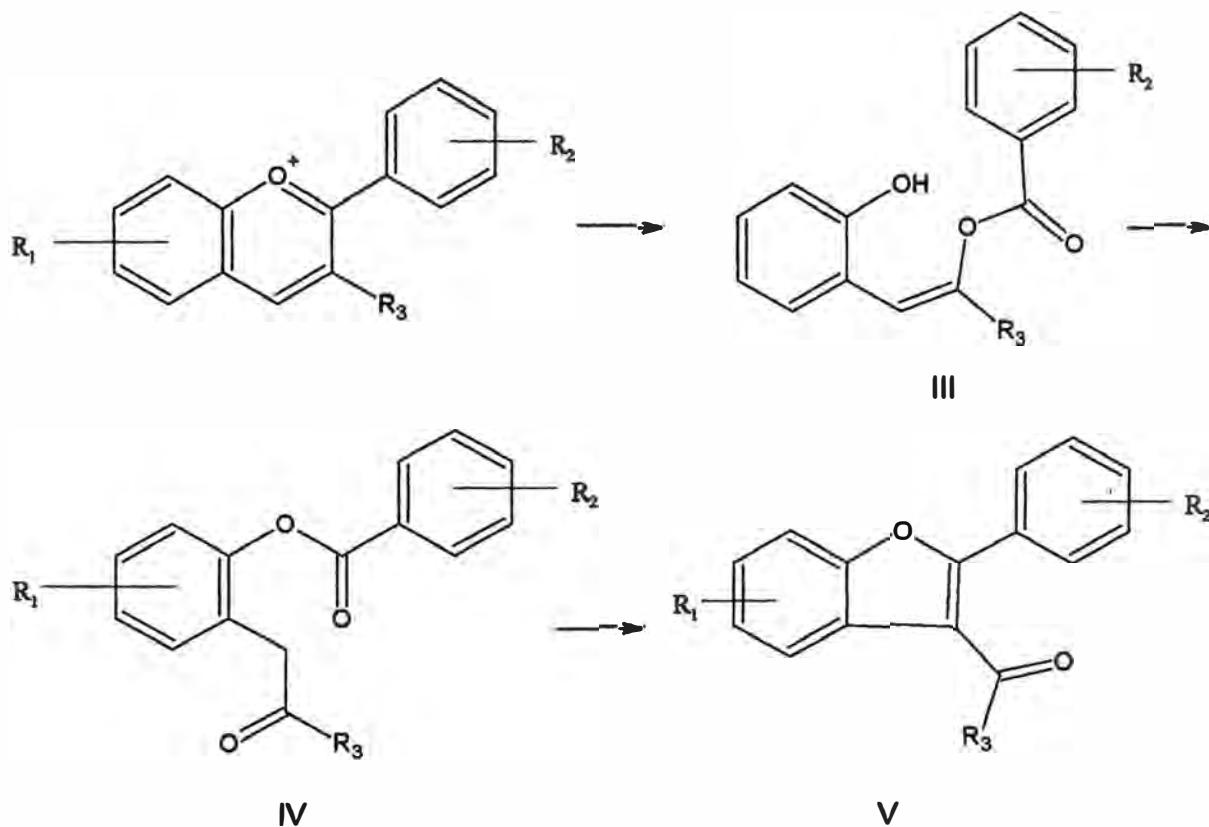
sido sugerida como un método para determinar la naturaleza de las unidades azúcares del C-3 y el C-5.

En estudios posteriores, Hrazdina y Franzese²⁵ en 1974 han encontrado que la reacción toma un curso diferente si se conduce a pH 7 en vez de pH 3 como describió Karrer²⁹. A pH 7 la antocianina existe casi exclusivamente como el cromenol y da el derivado cumarino (estructura II, página 42), como el producto principal.

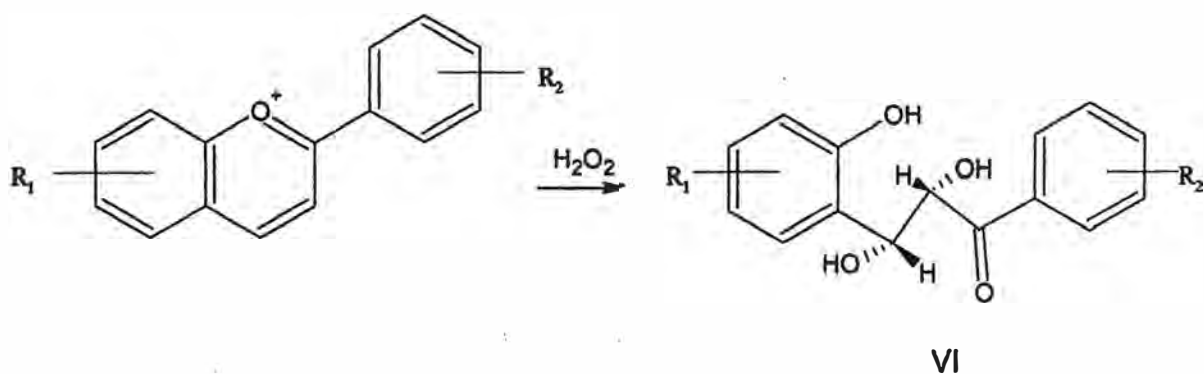


En base al reporte de Dilthey⁷ y Quint en 1931, Jurd²⁷ elucidó el curso de la oxidación con H_2O_2 de sales de flavilio simple. Cuando el catión flavilio contiene un sustituyente en 3- la oxidación ocurre en una serie de pasos dependiendo del pH. En ácido acético acuoso, anillo C se abre para dar el producto Baeyer-Villiger (estructura III, página 42). A pH más altos, entre 5-7, la transferencia acilo ocurre para dar el éster (estructura IV, página 43). El

cual produce el acil-benzofurano (estructura V, página 43). Un benzofurano de tipo 5 ha sido también aislado por Niebes y Janot³⁶ en 1970 de la cuidadosamente controlada oxidación de cianidina-3-glucósido-5-(6-O-p-cumaril-glucósido).

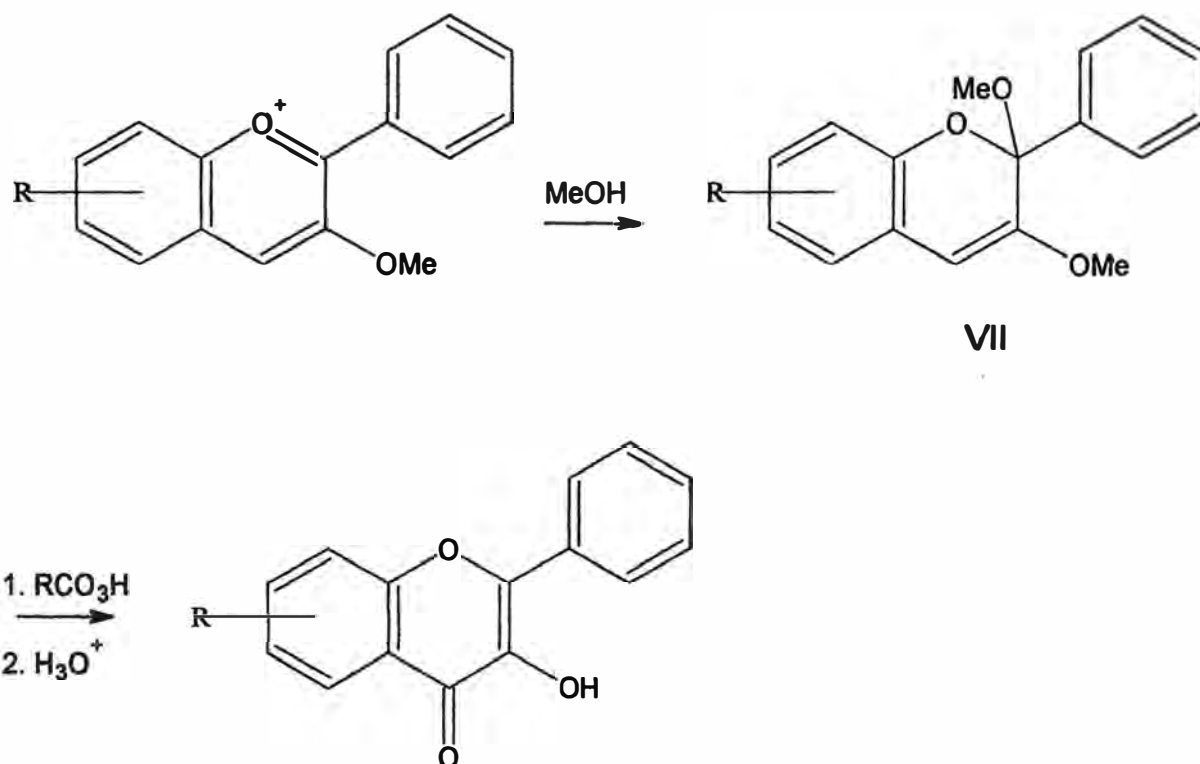


La sal de flavilio simple insustituida en la posición 3- sigue un diferente camino de oxidación, produciendo treodihidroxicetonas (estructura VI).



C.- Otras reacciones de oxidación.

A comienzos de los 40s Barrer encontró que la oxidación con ácido per-ftálico de la estructura VII, obtenido de una sal de flavilio 3-OCH₃ simple atacado con metanol, lleva al flavonol después de una hidrólisis. Tiempos después una sal de flavilio simple se estuvo transformando directamente a la flavona correspondiente con CrO₃ (reactivo de Sarett) o de mejor manera con Ti(NO₃)₃.



1.2.2.6 Extracción de antocianinas.

Todas las antocianinas son solubles en agua, pero insolubles en solventes no-hidroxílicos, tales como éter, acetona, cloroformo y benceno. Ellos precipitan completamente de soluciones acuosas o alcohólicas en la forma de sales azules de plomo, los cuales son solubles en ácido acético glacial dando un color rojo oscuro. El aislamiento de antocianinas de material vegetal esta

principalmente basado en este comportamiento, y la cristalización final se logra en general al tomar ventaja de la ligera solubilidad de las sales de oxonio en agua acidificada o alcoholes.

Como una regla, las antocianinas son extraídas de material vegetal seco a través de 1 a 2 por ciento de ácido clorhídrico metanólico (etanólico para el caso de alimentos) y luego precipitado por la adición de un pequeño volumen de éter. Cuando la extracción es hecha en materiales frescos, la precipitación mediante acetato de plomo es un paso necesario para su purificación. El compuesto de plomo azul es luego convertido en cloruro al disolver en 5 por ciento de ácido clorhídrico metanólico, y el pigmento es de nuevo precipitado con éter. Este procedimiento es repetido muchas veces si fuera necesario, y la cristalización final se efectúa a través de picrato o cloruro. Algunas antocianinas dan buena cristalización de picratos difícilmente solubles en agua fría (Tabla 1.5.) otros son obtenidos como cloruros cristalinos por la solubilidad moderada de los cloruros en ácido clorhídrico alcohólico o acuoso (ejemplo la pelargonina, cianina, queracianina, peonina, delfina, malvina, violanina, hirsutina, etc.) a excepción la mekocianina forma un compuesto de adición escasamente soluble con ferrocianuro de potasio.

Todos los métodos descubiertos para el aislamiento y purificación de antocianinas residen de uno o de la combinación de los procedimientos siguientes: Concentración al vacío del extracto crudo; purificación a través de la precipitación como sales de Plomo y/o de Picrato.

1.2.2.7 Propiedades espectrales

A.- Ley de Beer

En las moléculas a temperaturas ordinarias, los electrones están en orbitales de la energía más baja posible, estado que se conoce como *estado fundamental*. Los orbitales más altos están vacíos, pero se necesita energía para producir la transferencia (transición) de un electrón de un orbital de más baja energía a uno de más alta y la energía cinética de las moléculas no es suficientemente alta para poder hacerlo, salvo a temperaturas elevadas. Sin embargo ocurre que las vibraciones electromagnéticas de longitud de onda comprendida entre 100 y 1300 nm, esto es, en las regiones ultravioleta, visible e infrarroja cercana, tienen exactamente la gama de energía justa para cubrir el intervalo de energía de las transiciones electrónicas más bajas de las moléculas. Por ello, puede usarse la energía de un cuanto de luz para transferir un electrón desde su estado fundamental al orbital de más alta siguiente, durante cuyo proceso se absorbe luz de esa longitud de onda particular.

La representación gráfica que ordinariamente se usa para los espectros ultravioleta y visible difiere de la usada para espectros infrarrojos. La unidad de longitud de onda es el nanómetro (nm). La absorción se expresa como absorbancia, A (lo que antes se llamaba *densidad óptica*, OD , o *extinción*, E), que es el logaritmo del cociente entre la intensidad de la luz incidente, I_0 , y la intensidad de la luz transmitida, I , o el logaritmo de $1/T$, en que T , la transmitancia = I/I_0 . La intensidad de la luz ultravioleta o de la luz visible puede ser medida con exactitud más fácilmente que la intensidad de la radiación infrarroja y la absorción suele expresarse de modo cuantitativo más bien que

cualitativo. La absorbabilidad, a , es la absorbancia dividida por el producto de la concentración de la solución, en gramos por litro, c , por la longitud de recorrido de la muestra en centímetros, b .

$$a = \frac{A}{c \times b}$$

Si se conoce el peso molecular del compuesto, la absorción se expresa como absorbabilidad molar, ϵ (lo que antes se llamaba coeficiente de extinción molar), que es el producto de la absorbabilidad por el peso molecular.

$$\epsilon = \frac{A \times \text{peso mol.}}{c \times b} = \log \frac{I_0}{I} \times \frac{\text{peso mol.}}{c \times b}$$

Aunque las antocianinas exhiben característicamente absorción intensa en la región 500-550 nm, las diferencias en el espectro de los componentes individuales son sutilmente relativos. Por esta razón mediciones en el espectro no se han usado ampliamente en la identificación de las antocianinas naturales y sus agliconas; hasta que Bate-Smith en 1948⁸, 1949⁹ y 1954¹⁰ y Harborne²¹ en 1958 introdujeron efectivamente los procedimientos cromatográficos en papel para la separación de los pigmentos puros de antocianinas y modificación de sustancias en extractos de plantas.

La intensidad y posición del máximo visible de las antocianinas se desplazan considerablemente con cambios en el pH y solvente, la $\lambda_{\text{máx}}$ decrece sucesivamente en etanol, metanol y agua acidificados. La cianidina 3-ramnoglucósido, por ejemplo, tiene un $\lambda_{\text{máx}}$ de 507 nm en agua, 523 en metanol y 533 en etanol.

La adición de unas gotas de solución de AlCl_3 también producen un desplazamiento batocrómico (15-50nm) del

$\lambda_{\text{máx}}$ principal de aquellas antocianidinas derivadas las cuales contienen grupos hidroxilo adyacentes. El espectro de antocianinas los cuales no contienen un grupo o – dihidroxilo no son afectados en la adición de AlCl_3 . Este reactivo es ampliamente usado en la diferenciación de antocianidinas tales como cianidina y peonidina las cuales tienen casi idénticos espectros en alcohol.

B.- Antocianidinas

Una colección amplia de espectros de antocianinas con una descripción de los métodos para los cuales estos espectros se pueden usar para propósitos de identificación fue publicada por Harborne ²¹. En la tabla 1.8., se reportan las longitudes de onda de máxima absorción de las 10 antocianidinas que derivan de antocianinas naturales.

Tabla 1.8

Espectro de antocianinas en la región visible.

Pigmento	Metanol-HCl $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Etanol-HCl $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Desplazamiento con AlCl_3 (nm)
Hirsutidina	536	545	0
Malvidina	542	554	0
Petunidina	543	558	14
Delfinidina	546	557	23
Rosinidina	524	534	0
Peonidina	532	542	0
Cianidina	535	545	18
Pelargonidina	520	530	0
Luteolinidina	493	503	52
Apigeninidina	476	483	0

Fuente: Jurd Leonard (1962).

Es aparente que con la excepción de la delphinidina y petunidina cada una de estas antocianidinas pueden ser fácilmente distinguidas al medir sus espectros. Harborne ²¹ también señaló que la apigeninidina y luteolinidina, los cuales carecen de un grupo 3-hidroxilo, son únicos en dar absorción máxima estable en álcali-metanólico (a 532 y 553 nm respectivamente).

C.- Antocianinas

Con unas cuantas excepciones las antocianinas naturales conocidas son 3- o 5-mono-glicósidos o 3,5-diglicósidos de las antocianidinas. La glicosidación de las antocianidinas desplaza su $\lambda_{m\acute{a}x}$ alrededor de longitudes de onda más cortas. Los tres mayores grupos de glicósidos, aquellos basados en pelargonidina, cianidina y delphinidina, sin embargo, permanecen bien diferenciados espectralmente. Los 3-mono-glucósidos de pelargonidina, cianidina y delphinidina, por ejemplo, tienen $\lambda_{m\acute{a}x}$ 506, 525 y 535 nm respectivamente.

Adicionalmente, los glicósidos de la cianidina, delphinidina y de la petunidina pueden ser distinguidos por sus desplazamientos con $AlCl_3$.

La introducción de un azúcar dentro de las posiciones 3- ó 3,5- producen un desplazamiento hipsocrómico de 10-15 nm, así como cianidina ($\lambda_{m\acute{a}x}$, 535 nm), cianidin-3-monoglucósido ($\lambda_{m\acute{a}x}$, 525 nm), cianidin-3,5-diglucósido ($\lambda_{m\acute{a}x}$, 522 nm). La introducción de un azúcar dentro de una posición 5-, sin embargo, resulta en un desplazamiento hipsocrómico de solo 7 nm, así como pelargonidina ($\lambda_{m\acute{a}x}$, 520 nm), pelargonidin-5-glucósido ($\lambda_{m\acute{a}x}$, 513 nm). En base a

estas observaciones es posible distinguir glicósidos de posición 5- de glicósidos de posición 3- y de 3,5-.

Harborne²¹ además observó que el espectro de aquellas antocianinas cuyos grupos 5-hidroxilo están libres muestran un hombro distintivo en el mayor pico de absorción en la región 410 – 450 nm, pero por otro lado glucósidos y diglicósidos de posición 5- y 3,5- respectivamente muestran simplemente una inflexión de baja intensidad en esta región. Estas diferencias llegan hacer aparentes cuando la relación de densidad óptica en 440 nm a la del $\lambda_{\text{máx}}$ se calcula (Tabla 1.9.). El % de intensidad a 440 nm de una antocianina 5-O-sustituida es aproximadamente la mitad que la correspondiente antocianidina en las que el grupo 5-hidroxilo está libre. Esta relación, por lo tanto, parece mostrar un mayor uso para la diferenciación de glicósidos y diglicósidos en la posición 3- y 3,5- respectivamente.

Tabla 1.9
Espectro de antocianinas.

Cloruro de Antocianina		$\lambda_{m\acute{a}x}^i$ (nm)	$E_{440}/E_{m\acute{a}x}$ (%)
Derivados de Pelargonidina			
Con 5-OH	Pelargonidina	520	39
	Pelargonidina-3-monoglucósido	506	38
	Pelargonidina-3-gentiobiósido	506	36
Con 5-OR	Pelargonidina-5-glucósido	513	15
	Pelargonidina-3,5-diglucósido	504	21
Derivados de Cianidina			
Con 5-OH	Cianidina	535	19
	Cianidina-3-monoglucósido	525 ⁱⁱ	22
	Peonidina	532	25
	Peonidina-3-monoglucósido	523	26
Con 5-OR	Cianidina-3,5-diglucósido	522 ⁱⁱ	13
	Peonidina-3,5-diglucósido	523	13
	Peonidina-5-glucósido	528	12
Derivados de Delfinidina			
Con 5-OH	Delfinidina	544 ⁱⁱ	16
	Delfinidina-3-monoglucósido	535 ⁱⁱ	18
	Petunidina	543 ⁱⁱ	17
	Petunidina-3-monoglucósido	535 ⁱⁱ	18
	Malvidina	542	19
	Malvidina-3-monoglucósido	535	18
Con 5-OR	Delfinidina-3,5-diglucósido	534 ⁱⁱ	11
	Petunidina-3,5-diglucósido	533 ⁱⁱ	10
	Malvidina-3-rammoglucósido-5-glucósido	533	12
	Negreteína	536	9

ⁱ Medido en metanol con 0.01 % de HCl.

ⁱⁱ Solo estos pigmentos dan desplazamientos batocrómicos en la adición de AlCl₃ etanólico.

D.- Antocianinas aciladas

Las antocianinas simples exhiben un pico simple en el ultravioleta alrededor de 270 nm. Las antocianinas aciladas con ácido hidroxi-cinámico, sin embargo, muestran dos picos en el ultravioleta debido a la superimposición de la absorción del ácido cinámico (tabla 1.10.). La Monardeina, un glicósido de la pelargonidina acilada con ácido p-cumárico, por ejemplo, tienen picos a 313 y 286 nm mientras la salvianina, un derivado de ácido caféico, tienen picos a 329 y 285 nm.

Tabla 1.10
Espectro de antocianinas aciladas.

Antocianina	Aglicona	Grupo acil	λ_{max} (nm)ⁱ
Pelanina	Pelargonidina	p-ácido cumárico	289, 313, 505
Monardeina	Pelargonidina	p-ácido cumárico	286, 313, 507
Salvianina	Pelargonidina	Ácido cafeico	285, 329, 507
Rafanina A	Pelargonidina	p-ácido cumárico	286, 313, 505
Rafanina B	Pelargonidina	Ácido ferúlico	282, 328, 505
Petanina	Petunidina	p-ácido cumárico	282, 308, 536
Negreteina	Malvidina	p-ácido cumárico	282, 308, 535

Fuente: Jurd Leonard (1962).

1.2.2.8 Método de determinación de antocianinas totales e índice de degradación para el jugo de arándanos.

Método de Fuleki-Francis

El método descrito por Fuleki-Francis ¹³ se basa en la cuantificación de antocianinas en los arándanos (Cr Acys), sin embargo, este método desarrollado para arándanos puede ser utilizado para otros tipos de materiales vegetales y productos sólidos y semi-sólidos.

ⁱ Medido en metanol al 0.01 % de HCl.

La determinación de antocianinas totales involucra la medición de la absorbancia a 510 nm en muestras diluidas con buffers de pH 1.0 y 4.5. El contenido de pigmento es calculado en cantidades absolutas con la ayuda de los coeficientes de extinción establecidos para las antocianinas de los arándanos disueltas en los buffers.

Los arándanos y muchas otras frutas, así como los productos derivados de ellos, deben su atractivo color a la presencia de antocianinas (Acys). El contenido total de antocianinas (T Acys) varía en gran cantidad dependiendo de factores tales como especies, variedad, condiciones de crecimiento, estado fisiológico de la planta y fruta, tamaño, posición de la fruta en la planta, aplicación de químicos, etc. (Blank ⁴ 1958, Ribéreau– Gayón ⁴² 1959).

El total de antocianinas puede a veces ser determinado en extractos crudos, conteniendo otros compuestos fenólicos que suceden naturalmente al medir la absorbancia de la solución en una única longitud de onda. Esto es posible porque las antocianinas tienen absorción máxima en el rango de 510-550 nm (Harborne²¹ ·1958). Esto está muy distante de otros fenólicos comunes y el grupo de compuestos con los espectros máximos más cercanos a éste rango son los flavonoides con absorción máxima en la región 350-380 nm (Sondheimer⁴⁵ 1948).

Las antocianinas son un tanto inestables, particularmente en la forma pura y son, a veces, contaminadas con estos productos de degradación poliméricos. La presencia de impurezas, en muchos casos influye en una baja del valor del coeficiente de extinción. En adición a estos factores, la absorbancia de la molécula de antocianina también depende

del pH y la naturaleza del medio (Ribereau–Gayón⁴² 1959). Bajando el pH y/o el uso del medio alcohólico incrementa apreciablemente los valores del coeficiente de extinción de las antocianinas.

Alterando el pH no afecta la absorción de los productos de degradación (Sondheimer⁴⁴ 1948) mientras en la absorción de las antocianinas cambia en gran magnitud. Por estas razones, grandes esfuerzos fueron dirigidos hacia el desarrollo de un método de pH diferencial para la determinación Antocianinas Totales en el jugo de arándanos.

Determinación del medio y del pH

La absorptividad máxima fue determinada para jugo de arándanos (Cr J) a ser en 510 nm. Éste valor se uso como la longitud de onda de medición para la determinación de T Acys. El efecto del pH a la absorbancia con una longitud de onda de máxima absorción en medio alcohólico y acuoso para el jugo de arándanos es presentado en la figura 1.24. Los resultados muestran que no hay apreciable diferencia entre los dos métodos. En ambos casos, la más alta absorbancia se observó alrededor de pH 1.0 y cuando el pH aumentó, un agudo decrecimiento ocurrió en el O.D., nivelándose alrededor de pH 4.5. Estos resultados en general están de acuerdo con aquellos reportados por Sondheimer⁴⁵ en 1948, Dickinson⁶ en 1956 y Swain⁴⁷ en 1959 para medios acuosos.

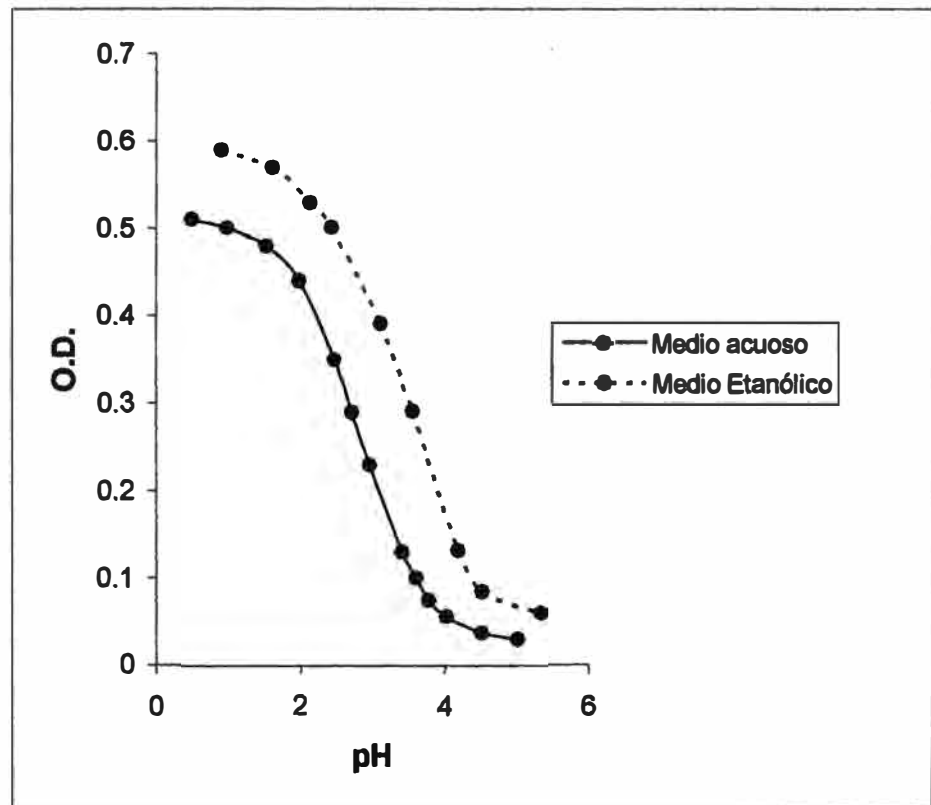


Fig. 1.24. El efecto del pH en el O.D. del Cr J a la absorción máxima en medio acuoso (510 nm) y medio etanólico (535 nm).
Fuente: T. Fuleki y F. Francis (1968).

Para garantizar una gran sensibilidad y exactitud de los valores de pH, el método de pH diferencial fue seleccionado por las siguientes razones:

- La diferencia en la absorbancia debe ser lo más grande, entre dos valores de pH donde las medidas fueron hechas.
- Pequeñas variaciones en el pH alrededor de los valores seleccionados para las medidas causarían sólo ligeros cambios en las absorbancias.
- Las antocianinas deben ser estables a valores de pH donde las medidas fueron hechas.

Considerando los requerimientos anteriores, los pH 1.0 y 4.5 fueron seleccionados para su utilización en el método diferencial de pH. Los datos presentados en la figura 1.24. muestran grandes diferencias en la absorbancia cuando en ambos casos son máximos para la absorción máxima, entre dos medios, mientras que los cambios en O.D. con ligeras variaciones de pH son despreciables.

El pH más alto descrito en la literatura para la determinación de T Acys fue 3.5 (Ribereau-Gayón 1964). Esto y la conocida inestabilidad de Acys a baja acidez requirieron un estudio de la estabilidad de Acy a pH 4.5. Los datos obtenidos de estabilidad con muestras triplicadas de Cr J son presentados en la tabla 1.11. La variación en O.D. a pH 4.5 fue remarcadamente pequeña, particularmente si es lo que se requiere – como ocurriría en las determinaciones de T Acy – en la diferencia en O.D. entre pH 1.0 y 4.5. En cualquiera de los dos casos, la variación debida a los cambios en la muestra pH 1.0 fue más grande que la del pH 4.5. La razón probable no era que las Acys fueran más estables a pH 4.5, sino la más alta sensibilidad de detección a pH 1.0 donde la absorción de la Acy fue aproximadamente siete veces que a pH 4.5. Los resultados en la tabla 1.11. demostraron que el pH 4.5 puede ser usado con seguridad para el medio de baja acidez. Otros trabajos reportaron mediciones a valores de pH los cuales reportan valores de O.D. en la parte acuosa de la curva pH vs. O.D. En tales casos, ligeras variaciones del pH resultan de grandes cambios en la lectura del O.D. Por ejemplo, el método clásico) empleó pH 2.0 y 3.4 para las mediciones. Ribéreau-Gayón en 1964 lo mejoró usando un medio más ácido (pH 0.6), pero aun manteniendo pH 3.5 para el medio de baja

acidez. Swain⁴⁷ et al en 1959 notó que a los valores de pH usados por Sondheimer⁴⁴ et al en 1948, el cambio de color en cambios ligeros de la acidez fue aun demasiado grande para asegurar la más alta precisión.

Tabla 1.11.

Estabilidad de las antocianinas del arándano en pH=1.0 y 4.5 de los buffers

Tiempo (horas)	Buffer pH=1.0		Buffer pH=4.5		Diferencia en O.D.
	pH	O.D.	pH	O.D.	
1	1.05	0.387	4.49	0.055	0.332
2	1.02	0.392	4.47	0.055	0.337
3	1.00	0.391	4.49	0.054	0.337
4	1.00	0.396	4.49	0.052	0.344
6				0.053	
24	1.02	0.397	4.50	0.049	0.348

Fuente: T. Fuleki y F. Francis (1968).

Para oponerse a este problema, ellos propusieron un pH 0.5 y 1.0, como los niveles de alta y baja acidez. Sin embargo, la diferencia de O.D. entre pH 0.5 y 1.0 para cada cantidad de Acy fue muy pequeña, por lo tanto la aplicación de la modificación de Swain⁴⁷ et al en en el método de pH diferencial resultaría en una gran disminución de la sensibilidad. Los valores de pH los cuales fueron demasiado altos también fueron empleados en las determinaciones de T Acys a pH simple (Fuleki, 1967¹²).

Solventes:

Los solventes usados fueron:

Buffer pH 1.0: 0.2N KCl – 0.2N HCl (25:67)

Buffer pH 4.5: Acetato de Sodio 1N – HCl 1N – Agua (100:60:90).

El pH de los buffers fue ajustado para obtener un pH final de 1.0 y 4.5 en la alícuota diluida con los buffers respectivos.

Período de equilibrio

Para determinar el tiempo requerido de las antocianinas en encontrar el equilibrio, alícuotas de 5 mL de jugo de arándanos fueron diluidos hasta 50 mL con cada uno de los buffers de pH 1.0 y 4.5. El O.D. a 510 nm fue medido en intervalos cortos en el Espectrofotómetro Hitachi Perkin-Elmer.

El cambio de O.D. a 510 nm en los primeros 6 minutos después de la adición de los buffers fue guardado en un Espectrofotómetro DB Beckman conectado a un Speedomax H (Leeds y Northrup Co., Philadelphia, Pa.) registrador de la secuencia que opera a la velocidad de 1.5 pulgadas por minuto.

Toma alrededor de una hora para que todas las formas de antocianinas lleguen a un estado de equilibrio después que el medio o la acidez del medio haya sido cambiada. Los datos presentados en la tabla 1.12, obtenido de muestras triplicadas diluidas de jugo de arándanos (Cr J) en dilución de 5:45 con los buffers, sustentó ésta conclusión. Ya que el tiempo requerido para encontrar el equilibrio a pH 1.0 es un poco largo, la extensión del periodo de equilibrio a 2 horas es deseable.

Frecuentemente se observó que una repentina intensificación de color, acompañado por un cambio hacia el azul, ocurrió cuando el buffer a pH 4.5 fue añadido a la alícuota de jugo de arándano (Cr J), ese color, sin embargo, lo perdió casi completamente en 4 minutos, esta observación apoya la teoría (Jurd²⁸ 1963; Bentley² 1960) de que la base de la decoloración del carbinol es formada a través de la base violeta anhidro. Para verificar éste fenómeno, los cambios en transmitancia a 510 nm de una alícuota de jugo de arándano diluido fueron grabados en los primeros 6 minutos, después de la adición del buffer de pH 4.5 (Buffer agregado en 2 minutos, Fig. 1.25). Este trazado de los cambios en transmitancia demuestra la súbita intensificación así como la pérdida gradual del color.

Tabla 1.12

Cambio del O.D. en 510 nm de la antocianina del arándano en buffers de pH=1.0 y 4.5 durante el periodo de equilibrio.

Tiempo (min.)	Buffer pH=1.0		Buffer pH=4.5	
	pH	O.D.	pH	O.D.
1		0.370		0.080
1 ½		0.370		0.065
2		0.371		0.060
5	1.03	0.373	4.50	0.058
10	1.02	0.378	4.49	0.057
30	1.02	0.381	4.49	0.055
60	1.02	0.385	4.49	0.054
120	1.02	0.388	4.48	0.054

Fuente: T. Fuleki y F. Francis (1968).

Establecimiento de los coeficientes de extinción

Fue necesario establecer valores de E para las antocianinas de los arándanos en el medio seleccionado para el método de pH diferencial en la determinación de las antocianinas totales. La diferencia en los valores de E entre los buffers de pH 1.0 y 4.5 (valores de ΔE) para las Cr Acys fue usado para calcular el contenido de T Acys en cantidades absolutas de las mediciones de O.D. obtenidos de la muestra de jugo de arándanos.

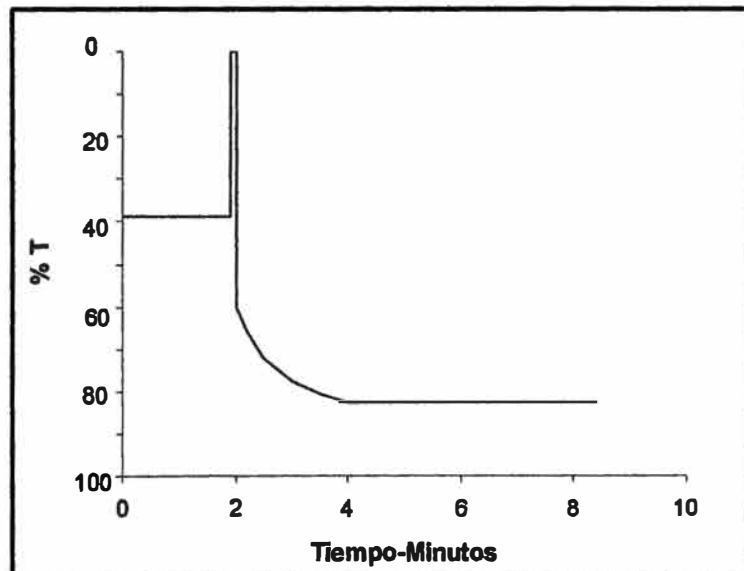


Fig. 1.25. Cambios producidos en la absorción del Cr J.

Fuente: T. Fuleki y F. Francis (1968).

Los E y los valores de ΔE para los buffers acuosos (tabla 1.13.) fueron establecidos al mismo tiempo como aquellos para el solvente extractor etanólico (Fuleki et al, 1968¹³). Una comparación de los valores de E para medio acuoso y etanólico mostró la influencia del solvente, de manera considerable, en la longitud de onda de máxima absorción en el rango visible del espectro. Los dos sistemas de

solventes comparables, teniendo el mismo pH (Buffer de pH 1.0 vs. Solvente Extractor), muestran que un cambio de sistema alcohólico a acuoso resulta en un desplazamiento hipsocrómico en el máximo visible de los pigmentos. Está muy estrechamente de acuerdo con los valores reportados en la literatura (Harborne ²¹, 1958; Ribereau-Gayon ⁴², 1959). Un pequeño cambio hipsocrómico (3nm) ocurre en la posición del máximo UV a 282 nm en un cambio similar del sistema solvente.

Tabla 1.13
Coefficientes de Extinción para antocianinas de arándano en medio acuoso.

	Buffer pH 1.0					Buffer pH 4.5					
	max 1	max 2	max 1	max 2	510 nm	max 1	max 2	max 1	max 2	510 nm	
Pigmento	λ (nm)		$E_{1cm}^{1\%}$			λ (nm)		$E_{1cm}^{1\%}$			$\Delta E_{1cm}^{1\%}$
Cy-3-Ga	512	279	851	553	851	517	279	86	460	86	765
Cy-3-Ar	516	279	903	1324	895	521	280	122	1224	122	773
Pn-3-Ga	512	278	887	604	886	517	277	88	418	88	798
Pn-3-Ar	512	277	858	702	858	512	277	95	606	95	763
Promedio (av)					873					98	775

Fuente: T. Fuleki y F. Francis (1968).

La absorbancia de Acys fue también afectada por el cambio del sistema alcohólico a uno acuoso. Con ambos medios a pH 1.0 los valores de E decrecen aproximadamente 10 % al máximo visible mientras un incremento considerable se observa en el máximo UV. Ribereau-Gayón ⁴² en 1959 reportó para la delphinidina, un decrecimiento de 34% de absorción al máximo visible y un pequeño decrecimiento a lo

largo del máximo de UV en el cambio del medio de etanol de 98% a agua conteniendo 10% etanol, ambos conteniendo la misma concentración de HCl. El cambio el pH no tiene efecto en la posición de la máxima absorción de Acys en el solvente alcohólico (pH 1.0 vs. 2.6) y tiene muy poca en el medio acuoso (pH 1.0 vs. 4.5). Como se observó, un decrecimiento en acidez redujo considerablemente los valores de E al máximo visible. En el medio acuoso donde la diferencia es la más grande, el cambio de pH 1.0 a 4.5 resulta en aproximadamente un decrecimiento en los coeficientes de extinción.

Un incremento en el pH del medio da un pequeño decrecimiento en los índices de absorbancia al máximo UV. La absorbancia decrecida al máximo visible en incremento de pH fue reportada por diferentes autores (Sondheimer⁴⁵ et al., 1948; Sondheimer⁴⁶, 1953; Dickinson⁶ et al., 1956; Swain⁴⁷ et al., 1959; Ribereau-Gayón^{42,43}, 1959, 1964). Poca información está disponible en el efecto del pH en valores de extinción al máximo UV. Ribereau-Gayón en 1959 y 1964^{42,43} reportó un gradual pero pequeño decrecimiento en los coeficientes de extinción a 280 nm a medida que el pH fue incrementado.

El valor de $av \Delta E_{1cm}^{1\%} 510$ para las Cr Acys (775) se usa en el método del pH diferencial desarrollado en este estudio. Sin embargo, si se desea un método simplificado y anticipado que no haya interferencia de varios productos de degradación, entonces es suficiente medir el O.D. sólo a pH 1.0 y calcular la cantidad aproximada de Acy total usando el $av E_{1cm}^{1\%} 510$ obtenido en el buffer pH 1.0 (873), (Fuleki¹³ et al., 1968).

Método del pH simple para determinar antocianinas totales

En jugos con pigmento no degradado, es suficiente usar un método de determinación de T Acys de pH simple. El O.D. se mide a 510 nm en una muestra diluida con el buffer a pH 1.0. El T O.D. se calcula usando la ecuación 1.2. Las T Acys se calculan como sigue:

$$T \text{ Acys mg por } 100 \text{ mL} = \frac{\text{TO.D.}}{\frac{\text{av } E_{510}^{1\%}}{1 \text{ cm}}} = \frac{\text{TO.D.}}{87.3} \dots\dots\dots (1.1)$$

El dato presentado en la tabla 1.9. muestra que la diferencia en ambos valores de E y ΔE entre Cr Acys es despreciable para el trabajo en general. Un método empleando aproximaciones sucesivas puede ser aplicado si se requiere una precisión más alta (Fuleki ¹², 1967).

$$T \text{ O.D.} = O.D. \times DV \times VF \dots\dots\dots (1.2)$$

Donde:

O.D. = La lectura de la absorbancia en la muestra diluida (celda de 1 cm).

DV = Volumen Diluido o el volumen en mililitros de la muestra diluida preparada para la medición del O.D.

VF = Factor Volumétrico, el cual corrige la diferencia de magnitud entre el volumen original (OV), usualmente 100 mL, para el cual se hace el cálculo y el Volumen de la Muestra (SV) o el volumen de la alícuota del Cr J usado en

preparar la muestra diluida para la medición de la absorbancia.

$$VF = \frac{OV}{SV} = \frac{100}{SV} \text{ (Para 100 mililitros)} \dots\dots\dots (1.3)$$

Si se desea expresar el T Acys en mg Acys por 100 g de bayas, el T OD calculado para 100 mL de extracto deberá ser pasado a éstas unidades según:

$$T \text{ O.D. por } 100 \text{ g} = T \text{ O.D. por } 100 \text{ mL de extracto} \times \frac{TEV}{CrW} \dots(1.4)$$

Donde:

TEV = Volumen de extracción total. El volumen total del extracto en mLs.

Cr W = Peso de arándanos en g usado para la extracción.

Método de pH diferencial para determinar antocianinas totales

La diferencia en T O.D. entre las alícuotas de jugo de arándanos diluidas a pH 1.0 y 4.5 (Δ O.D.) fue calculado como sigue:

$$\Delta \text{ O.D.} = T \text{ O.D.}_{pH 1.0} - T \text{ O.D.}_{pH 4.5} \dots\dots\dots (1.5)$$

El contenido de T Acy en mg por 100 mL de jugo de arándanos, o para el OV, es calculado del valor Δ O.D. con la ayuda del av $\Delta E_{1cm}^{1\% 510}$ para Cr Acys (775).

$$T \text{ Acy, mg por } 100 \text{ mL} = \frac{\Delta O.D.}{\frac{av \Delta \Delta 510_{1cm}^{1\%}}{10}} = \frac{\Delta O.D.}{77.5} \dots\dots\dots(1.6)$$

Índice de degradación

Una gran ventaja del método propuesto de pH diferencial para determinación de T Acy es que el dato obtenido puede ser también usado para el cálculo de un índice, el cuál es un indicador de la proporción de Acys degradadas en la muestra. Es un índice muy útil, particularmente en casos donde el contenido original de Acy no se conoce y es necesaria una medida del estado de degradación de la Acy. El contenido de Antocianinas Totales de la muestra es determinada usando el método simple y el método del pH diferencial. El Índice De Degradación (ID) es calculado como sigue:

$$ID = \frac{T \text{ Acy por el método de pH simple}}{T \text{ Acy por el método de pH diferencial}} \dots\dots\dots (1.7)$$

En la mayoría de casos particularmente donde las antocianinas no están definidas o los valores de extinción no son conocidos, un ID simplificado ($ID_{\text{simp.}}$) puede ser obtenido usando la siguiente ecuación:

$$ID \text{ simp.} = \frac{TO.D._{pH1.0}}{\Delta O.D.} \dots\dots\dots (1.8)$$

El ID simplificado está basado en el principio que las medidas obtenidas a pH 1.0 incluirán la absorción de las antocianinas degradadas y no degradadas, mientras la

diferencia de absorción entre el medio de pH 1.0 y pH 4.5 incluye sólo a las antocianinas no degradadas. Muestras que no contienen productos degradados u otros compuestos coloreados parduscos, deberían dar casi idénticos resultados para Antocianinas Totales con los métodos de pH diferencial y simple. Sin embargo, como la degradación continua, la cantidad de pigmentos marrones parduscos incrementarán. Consecuentemente, las Antocianinas Totales determinadas con el método de pH simple serán más altas que el determinado con el método del pH diferencial y el índice de degradación (ID) será mayor a 1.0.

El valor del ID simplificado es mayor que 1.0 aun para muestras frescas que no contengan productos degradados porque las Antocianinas tienen una pequeña absorción a pH 4.5 el cual es reflejado por el hecho de que los valores de $\Delta E_{1\text{cm}}^{1\% 510}$ son más pequeños que el correspondiente valor de $\Delta E_{1\text{cm}}^{1\% 510}$ en el medio de pH 1.0.

Los valores de ID e ID simplificado son calculados para las muestras usadas en el establecimiento de la precisión del método de pH diferencial para la determinación de Antocianinas Totales (T Acys), tabla 1.14. Los valores bajos de ID indicaron que el extracto de arándano usado no muestra prácticamente degradación.

El propuesto ID y/o ID simplificado puede ser adaptado fácilmente para otras frutas, jugos de bayas y vinos. La ventaja de éste nuevo ID es que no requiere ninguna medida adicional. El cálculo del valor del ID está basado en las mediciones de absorbancia tomadas para la determinación del contenido de T Acys por el método de pH diferencial. El ID junto con el contenido de T Acys debería

dar una medida no sólo del contenido de pigmento y estado de degradación de antocianinas sino del color de la muestra también.

Tabla 1.14
Determinación de antocianinas totales por el método del pH diferencial en 10 muestras idénticas de jugo de arándanos.

Muestra N°	pH 1.0		T Acy mg/100mL	pH 4.5		Δ O.D.	T Acy mg/100mL	ID	ID simp.
	O.D.	T.O.D.		O.D.	T.O.D.				
1	0.338	845	9.69	0.153	77	768	9.90	0.98	1.10
2	0.333	833	9.54	0.148	74	759	9.79	0.97	1.10
3	0.335	838	9.60	0.145	73	765	9.87	0.97	1.10
4	0.338	845	9.68	0.152	76	769	9.92	0.98	1.10
5	0.334	835	9.56	0.156	78	757	9.77	0.98	1.10
6	0.337	843	9.66	0.148	74	769	9.92	0.97	1.10
7	0.341	853	9.77	0.150	75	778	10.03	0.97	1.10
8	0.336	840	9.62	0.152	76	764	9.85	0.98	1.10
9	0.337	843	9.66	0.153	77	766	9.88	0.98	1.10
10	0.338	845	9.68	0.154	77	768	9.90	0.98	1.10
Media		842	9.65		75.5	766	9.88	0.98	1.10
Coef. Var. %		0.69	0.69		2.25	0.76	0.76	0.54	0.00

Fuente: T. Fuleki y F. Francis (1968).

Recomendaciones para un buen uso del método

Frecuentemente un método de determinación simple directa de Antocianinas Totales (T Acys) no puede ser aplicado por la interferencia debido a la clorofila o sus productos de degradación, como en frutas maduras (Swain⁴⁷, 1959) o productos de degradación pardos formados, o bien de reacciones ácidas azúcar-amino (Dickinson⁶, 1956) o de la

degradación de antocianinas (Acys). En tales casos, se usan métodos indirectos para determinar el contenido de Total de Antocianinas. Es por ellos que en casos donde productos de degradación estén presentes el método de pH diferencial (pH 1.0 y 4.5) debe ser usado, de modo contrario el método simple (pH 1.0) sería el adecuado.

La absorción máxima y absorbancia molar, usado en métodos espectro-fotométricos simples son marcadamente afectados por el pH (Sondheimer⁴⁶, 1953; Ribereau-Gayón, 1959), solvente (Harborne²¹, 1958), presencia de ciertos metales (Jurd²⁷, 1962), tiempo de inmersión en el solvente y temperatura. En adición a éstos, las relaciones directas entre concentración y absorbancia pueden ser percibidas sólo a bajas concentraciones, por eso una dilución considerable es usualmente necesaria.

1.2.2.9 Identificación de antocianinas y antocianidinas naturales.

El procedimiento rápido y simple para el análisis de antocianinas es de principal importancia para el estudio de la distribución del pigmento en la naturaleza, especialmente por seguir sus rasgos biosintéticos en células y tejidos vivos. En 1931 se creó un esquema de análisis de pigmento el cual depende primariamente de las reacciones de color característicos combinados con inspecciones de la distribución de pigmentos entre dos solventes inmiscibles. Sin embargo, esto ha sido sustituido desde 1948 por un procedimiento más directo y conveniente de cromatografía en papel iniciado por Bate-Smith ⁸ y luego extendido por muchos otros investigadores. El perfil de estos dos procedimientos importantes es:

A.- Identificación a través de reacciones de color y comportamiento de partición:

Preparación y purificación de los extractos. Pétalos frescos son extraídos en frío con 1% de ácido clorhídrico acuoso, y la solución es purificada, si fuera necesario, por cualquiera de los siguientes métodos:

- Los extractos ácidos acuosos de antocianinas diglicosídicas pueden ser satisfactoriamente purificadas por lavados sucesivos con alcohol amílico.
- Las antocianinas son transferidas del extracto crudo a una mezcla de alcohol amílico (2 partes) y acetofenona (una parte) conteniendo ácido pícrico. Los pigmentos en la fase orgánica son luego llevados a 1 % de ácido clorhídrico por la adición de éter. La solución de pigmento acuosa es luego repetidamente extraída con éter para remover trazas de ácido pícrico.
- Las soluciones conteniendo monoglicósidos pueden ser suficientemente purificada por extracción ya sea con ciclohexanona o acetato de etilo ambos conteniendo ácido pícrico, la fase orgánica es tratada con éter de petróleo y extraído con 1% de ácido clorhídrico. La solución acuosa resultante es luego lavada completamente con ciclohexanona y benceno.

Pruebas de color para antocianinas:

Si una solución de acetato de sodio acuoso es añadida a las soluciones anteriores de antocianinas, se pueden observar los cambios de color en la tabla 1.15.

Tabla 1.15
Color de antocianinas.

Callistefina	Opaco Parduzco- violeta -rojo
Pelargonidina Peonidin-3-glicósidos	Azulado brillante- rojo
Peonina	Rojizo-violeta
Cianina	violeta
Crisantemina Mekocianina	Violeta-rojo
Malvina	Violeta brillante
Oenina	Violeta opaco
Glicósidos de la Delfinidina	Azul-violeta a azul

Fuente: Kozo Hayashi (1962).

No hay diferencia apreciable entre un espectro, en la zona UV-Visible, de antocianina y betacianina, como para afirmar la presencia segura de uno de ellos en una mezcla desconocida, para ello existen pruebas de color que diferencian a éstos dos tipos de compuestos químicos, que se presenta en la tabla 1.16. La distinción de uno de ellos en un fruto es determinante en muchos casos, ya que hay que considerar que hasta ahora no se han encontrado los dos tipos de compuestos en un mismo fruto, ni siquiera en plantas de una misma familia.

Tabla 1.16
Ensayos simples de coloración para la diferenciación de antocianinas y betacianinas.

Ensayo	Antocianina	Betacianina
Adición de álcali (KOH, NaOH)	Decoloración lenta de violeta, vía azul y verde, a amarillo	Decoloración rápida a amarillo
Reacidificación de la solución alcalina después de unos minutos	El color rojo puede ser regenerado con la acidificación	El color rojo no es regenerado con la acidificación (podría regenerarse parcialmente si hay una inmediata reacidificación)
Adición de amoníaco	Igual comportamiento que con los otros álcalis	El color permanece violeta por algún tiempo, en frío
Adición de ácidos minerales	Solución viene a ser un rojo más claro	Solución viene a ser un violeta más oscuro
Adición de acetato de plomo	Ppdo. Azul-verdoso o azul grisáceo	Ppdo. Rojo-marrón
A pH 7.0	Solución decolora lentamente	Solución permanece violeta
Distribución entre agua y alcohol amílico	La fase alcohol amílico adquiere color rojo a pH ácido	La fase alcohol amílico no adquiere el color rojo
Extracción del material seco: 1. con alcohol absoluto 2. con agua destilada	Se extrae algo de color rojo Se extrae algo de color, siendo el extracto de color verdoso, que se vuelve rojo con acidificación	No se extrae el color rojo El color rojo es extraído rápidamente

Fuente: Olga Lock Sing, 1997.

Reactivo para la cianidina

Una cantidad de la solución es agitado con un volumen igual de una mezcla de ciclohexanol (una parte) y tolueno (cinco partes).

Reactivo para la delphinidina

Una cantidad se agita con una solución al 5% de ácido Pírico en una mezcla de éter etil amílico (una parte) y anisole (cuatro partes).

Prueba de oxidación

Una porción se agita al aire y se le añade la mitad de su volumen de 10% de hidróxido de sodio acuoso. La solución es inmediatamente acidificada con ácido clorhídrico concentrado y extraído con alcohol isoamílico para luego anotar el grado de recuperación de la antocianidina.

Prueba de color

A una porción del extracto de alcohol isoamílico, se añade una solución acuosa de acetato de sodio y el color se nota. Luego se añade una gota de solución de cloruro férrico, el tubo se agita suavemente y se observa el color de nuevo. Los resultados standards son adjuntados en la tabla 1.17.

Tabla 1.17
Reacciones características para antocianidinas representativas.

Reactivo	Pelargonidina	Cianidina	Malvidina	Petunidina	Delfinidina
Reactivo Cianidina	principalmente extraído	imparte un color rosa-rojo	no extraído	No extraído	No extraído
Reactivo Delfinidina	completamente extraído	No completamente extraído	Completamente extraído	No extraído	No extraído
Prueba de Oxidación	no destruido	Bastante estable	casi inalterado	Destruído	Destruído
Prueba de color (AmOH-NaOAc)	violeta-rojo	Rojizo-violeta	azulado-violeta	Violeta-azul	Azul

Fuente: Kozo Hayashi (1962).

B.- Identificación a través de cromatografía en papel:

Análisis de antocianinas.

Desde que la cromatografía en papel fue por primera vez introducido por Bate-Smith ⁸ en 1948 en el estudio de antocianinas y otros pigmentos solubles en la savia de la célula, ha mostrado por un número de investigaciones que ésta es la herramienta más útil para la separación e identificación de los pigmentos individuales, especialmente haciendo un estudio sobre su distribución en el mundo vegetal y también al estudiar su aparición o desaparición de los pigmentos durante el curso del proceso metabólico el cuál tiene lugar hasta en un estricto control de genética y condiciones fisiológicas.

Las técnicas se han descrito en numerosas publicaciones y adjuntados por Geissman en 1955. El procedimiento que

parece más conveniente para el análisis del extracto de antocianinas crudo se describirá como un ejemplo. La antocianina se extrae de muchas flores frescas por medio de ácido clorhídrico metanólico al 1% en frío. Un concentrado del pigmento acuoso se separa fácilmente al agitar con un exceso de éter puro. La capa acuosa es separada del flotante y lavada con éter de petróleo y benceno. Valores de R_f para cierto número de antocianinas se dan en la tabla 1.18. Información muy usada como el número de restos de azúcares ligados a la antocianidina puede ser obtenido del análisis de los productos de la hidrólisis parcial. Abe y Hayashi¹ en 1956 han encontrado que por la acción de ácido clorhídrico al 20% a 70 °C, las antocianinas diglicosídicas sufren una liberación gradual de sus restos azúcares resultando la formación de especies menos glicosídicas intermedias, el cual puede ser claramente demostrado en la cromatografía durante las distintas etapas de la hidrólisis. Por ejemplo, el cloruro de cianina, el 3,5-dimonósido de cianidina, puede ser degradado por este tratamiento en dos productos intermedios, el 3-monósido (crisantemina) y el 5-monósido (cianenina), ambos son convertidos después en la cianidina libre de azúcar. Por otro lado, en el caso de 3-monósido (crisantemina) se produce directamente la aglicona, mientras que en el caso del 3-biosido ocurre una hidrólisis gradual vía el monósido.

Tabla 1.18.
Valores de Rf de las principales antocianidinas y antocianinas.

	AcOH- HCl conc. -H₂O 5:1:5 (V/V)	BuOH- AcOH-H₂O 4:1:5 (V/V)	2 N HCl [Bate- Smith]
Antocianidinas			
Pelargonidina	0.55	0.80	
Cianidina	0.34	0.69	
Peonidina	0.50	0.72	
Delfinidina	0.22	0.35	
Malvidina	0.43	0.53	
Hirsutidina		0.72	
Glicósidos de pelargonidina			
Callistefina			0.52
Pelargonina	0.82	0.36	0.20
Glicósidos de cianidina			
Crisantemina	0.61	0.40	0.27
Idaneina	0.61	0.37	
Hicicianina	0.85	0.40	
Mekocianina			0.22
Keracianina	0.74	0.41	0.28
Cianina	0.70	0.23	0.08
Glicósidos de peonidina			
Oxycoccianina			0.31
Peonina	0.83	0.31	0.10
Glicósidos de delfinidina			
Delfinidina-3-glucósido	0.46	0.24	0.14
Empetrina	0.46	0.22	
Tulipanina		0.24	
Delfinina	0.55	0.11	0.06

Fuente: Kozo Hayashi (1962).

Tabla 1.18. (Continuación)
Valores de Rf de las principales antocianidinas y antocianinas.

	AcOH- HCl conc. -H ₂ O 5:1:5 (V/V)	BuOH- AcOH-H ₂ O 4:1:5 (V/V)	2 N HCl [Bate- Smith]
Glicósidos de malvidina			
Oenina			0.23
Malvina	0.84	0.30	0.07
Uliginosina	0.74	0.38	0.24
Glicósidos de hirsitudina			
Hirsutita			0.07

Fuente: Kozo Hayashi (1962).

Análisis de la antocianidina.

La identificación final de la antocianina se logra al analizar el pigmento libre de azúcar al observar los valores Rf, colores de reacciones y espectros de absorción. El procedimiento usado en general brevemente es como sigue: cada eluyente metanólico obtenido al extraer las antocianinas individuales de un papel cromatográfico es tratado con una pequeña cantidad de ácido clorhídrico acuoso al 20% y gran exceso de éter y mezclado. El pigmento es luego transferido completamente dentro de una capa acuosa, el cual es separado del flotante y evacuado para separar cualquier traza de éter y metanol y luego es calentado en un baño de ebullición por alrededor de 3 min. La solución es enfriada rápidamente y extraída con alcohol amílico, y la capa orgánica es lavada con agua. El extracto de alcohol amílico que contiene la antocianidina se seca y luego se le corre una cromatografía en papel.

La tabla de valores de Rf (tabla 1.19.) puede servir como una guía en estudios comparativos del pigmento desconocido con la antocianidina autentica sospechosa. En el caso de las antocianinas, comparaciones muy cuidadosas de los cromatogramas individuales preparados con dos o más sistemas de solventes ofrecen una identificación absoluta, ya que el posible error disminuye cuanto más grande es el número de solventes aplicados.

Tabla 1.19.
Rf y color visible de las antocianidinas en soluciones BAW y Forestal

Antocianidina	Color Visible	Rf en	
		Forestal	BAW
Pelargonidina	Rojo	0.68	0.80
Cianidina	Magenta	0.49	0.68
Peonidina	Magenta	0.63	0.71
Delfinidina	Púrpura	0.32	0.42
Petunidina	Púrpura	0.46	0.52
Malvidina	Púrpura	0.60	0.58

Fuente: Olga Lock Sing, 1997.

C.- Espectro de absorción como una herramienta para propósitos de identificación

Debido a los limitados esquemas de hidroxilación involucrados en antocianinas naturales, el espectro de absorción es de menor importancia para la identificación de pigmentos individuales, especialmente en bajas condiciones de pureza. Los espectros de absorción de antocianidinas y antocianinas fueron antiguamente investigados en detalle por Hayashi y colaboradores en 1933²³. Los datos de

espectros antiguos no proporcionan suficiente confiabilidad, porque la máxima absorción y aún la forma de la curva (de pelargonidina, por ejemplo) difieren grandemente de aquellas medidas por equipos espectrofotométricos modernos. Harborne²¹ ha publicado recientemente datos para unas cincuenta antocianidinas y antocianinas hasta ahora encontradas en la naturaleza. El espectro de absorción puede ser grandemente afectado por la presencia de algunas impurezas o co-pigmentos. Por lo tanto, se debe tomar precaución en la aplicación del dato espectral puro para la identificación de pigmentos individuales. Sin embargo, si se usaran juntos, la separación en papel cromatográfico y purificación, pueden ser de valor para identificar los pigmentos libres de azúcar obtenidos de extractos de plantas.

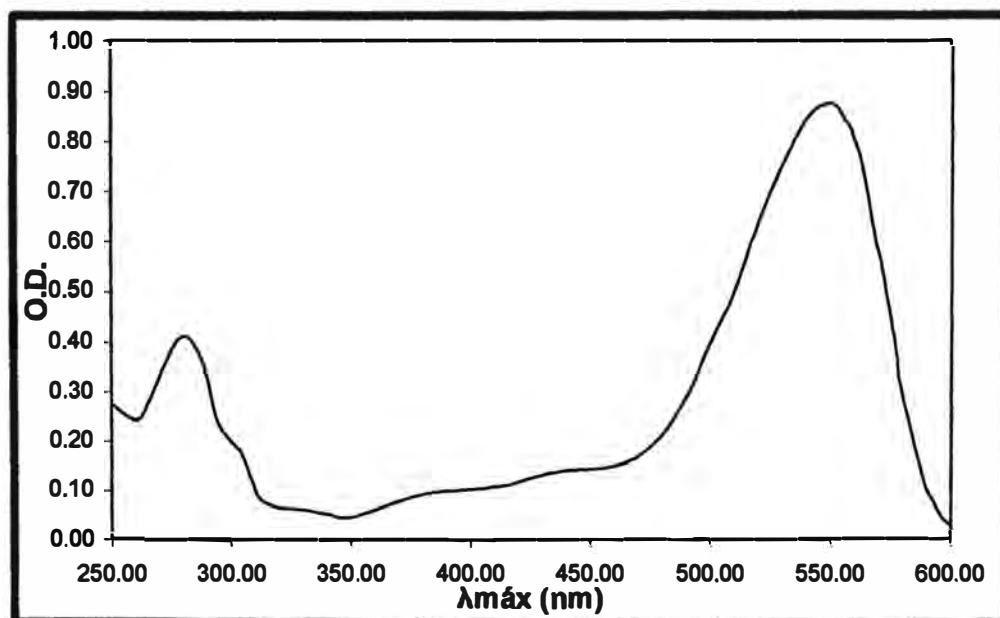


Fig. 1.26. Espectro de Absorción UV-Visible de la Cianidina (2×10^{-5} mol en EtOH (0.1% HCl)); 551,278-9 nm.

Fuente: Kozo Hayashi (1962).

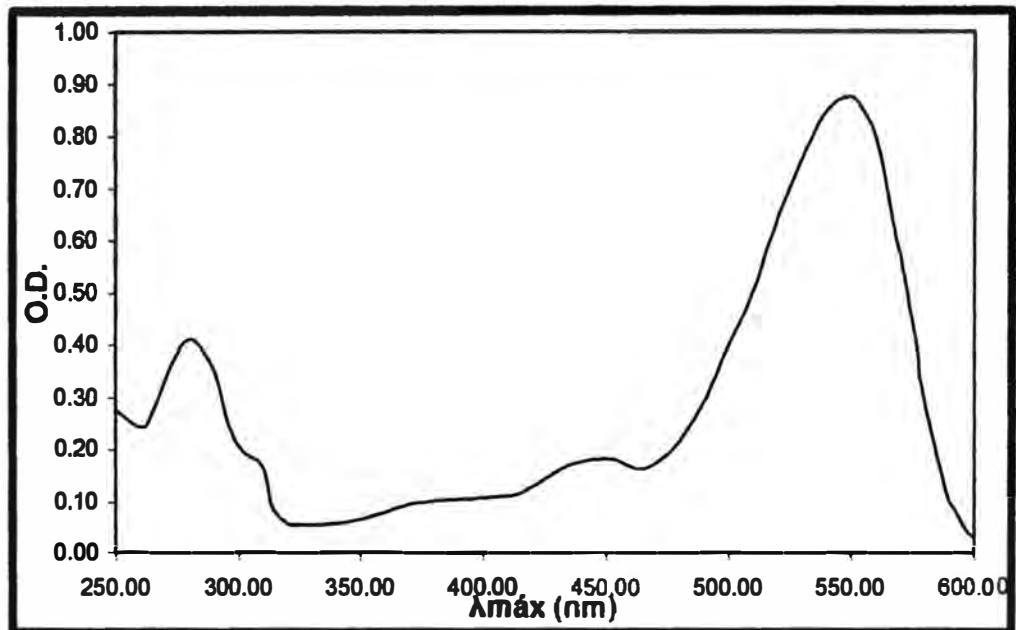


Fig. 1.27. Espectro de Absorción de la Peonidina (2×10^{-8} mol en EtOH (0.1% HCl)); 549,448,276-7 nm.

Fuente: Kozo Hayashi (1962).

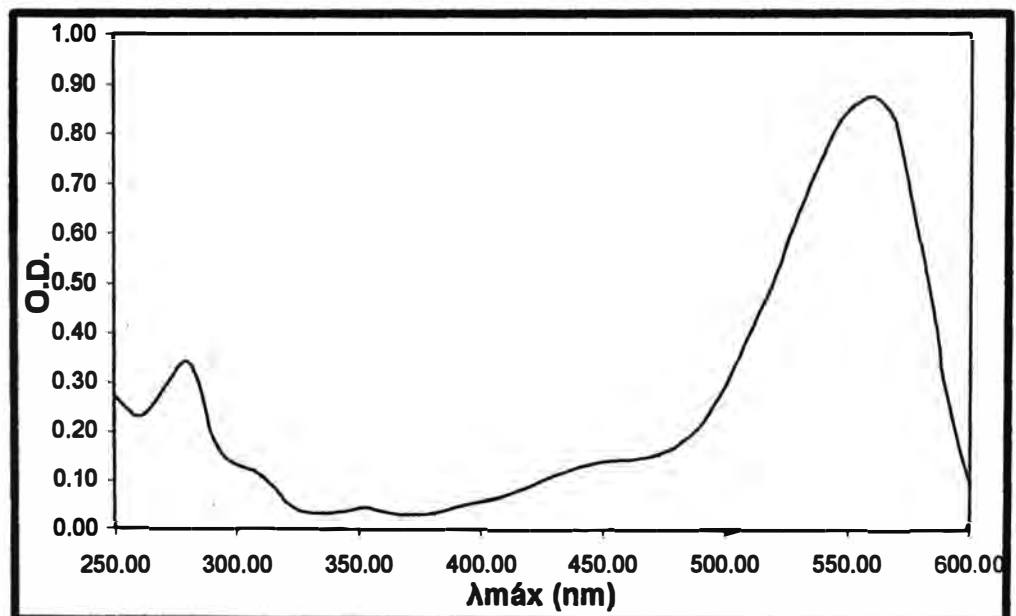


Fig. 1.28. Espectro de Absorción de la Delphinidina (2×10^{-8} mol en EtOH (0.1% HCl)); 561,357,276-7 nm.

Fuente: Kozo Hayashi (1962).

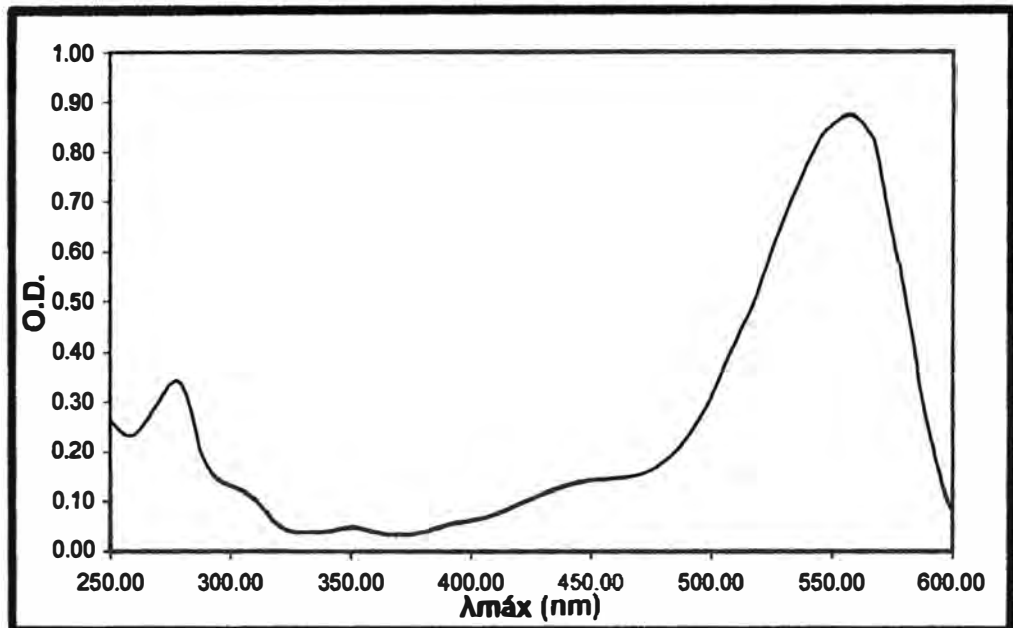


Fig. 1.29. Espectro de Absorción de la Malvidina (2×10^{-8} mol en EtOH (0.1% HCl)); 559,355,276-7 nm.

Fuente: Kozo Hayashi (1962).

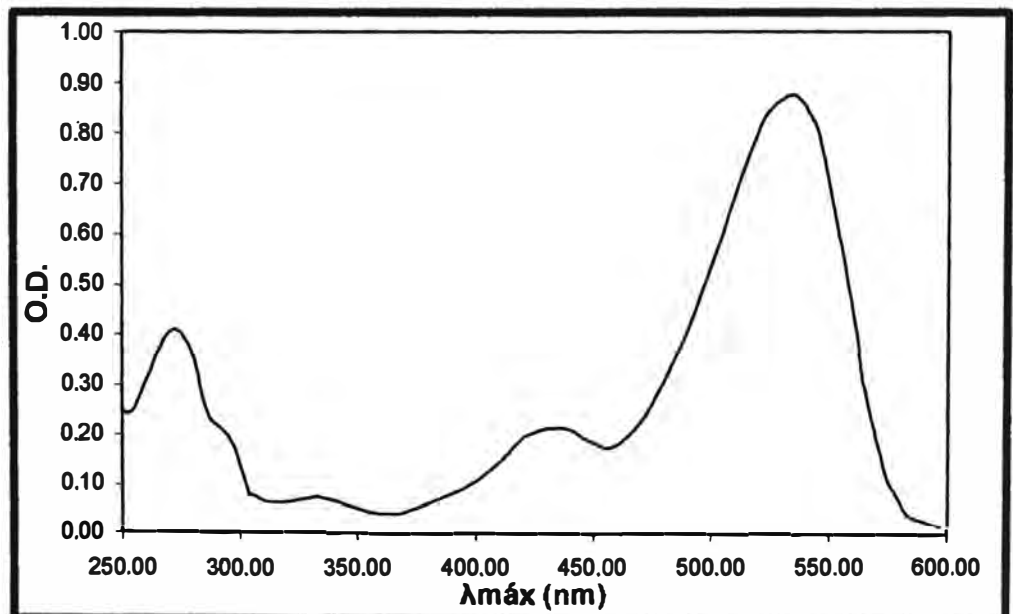


Fig. 1.30. Espectro de Absorción de la Pelargonidina (2×10^{-8} mol en EtOH (0.1% HCl)); 535,435,335,270 nm.

Fuente: Kozo Hayashi (1962).

CAPÍTULO II

DESARROLLO EXPERIMENTAL DE LA SEPARACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS DE LA MISHQUIPANGA

2.1 MUESTREO

Las muestras cosechadas de cada variedad desde Moyabamba, se trata de que sean obtenidas de un solo lugar, ya que la planta es silvestre su desarrollo depende de la naturaleza del ambiente donde crece. Y se toma aproximadamente, 1 Kg de muestra de cada variedad que se envía a Lima, por lo tanto se inicia el trabajo en laboratorio con un peso de muestra representativa de alrededor de 3 kilos de muestra de las tres variedades.

2.2 PREPARACIÓN DEL FRUTO (Mishquipanga).

Procedimiento

2.2.1 Selección

Una vez llevado el fruto al laboratorio se procede a escoger las bayas en buen estado, ya que el material puede dañarse por las condiciones en que se transporta desde Moyobamba a lima. Entonces una parte del lote que llega (no una parte considerable) es necesario separar del que se usará para el estudio.

2.2.2 Pelado

Se separa manualmente la cáscara del fruto, del material elegido para el estudio, previo corte de su flor (en el caso de la variedad 1, donde almacena agua), con cuidado de tener

las menores pérdidas posibles del colorante que se adhiere fácilmente a las manos.

2.2.3 Secado

El estudio experimental de la cáscara se lleva a cabo en base seca, como normalmente se realizan los estudios de analitos vegetales, ya que el agua contribuye bastante a la reproducción de microorganismos que degradan rápidamente todo material vegetal (como hongos por ejemplo). El secado se desarrolla en campo abierto en la ciudad de Jauja (Valle del Mantaro-Junín), aprovechando el aire de baja humedad, la altura que genera una menor presión que favorece la evaporación del agua del lote de cáscaras y convección (ya que fue en campo abierto). Contando con sólo un día de exposición al ambiente.

2.2.4 Cálculo del contenido de humedad en la cáscara

La humedad se evalúa en las tres variedades de las cuales se toman cinco muestras de la variedad 2 y 3 y seis muestras al azar, pero en buenas condiciones, del lote de variedad 1, esos números de repeticiones se dan de acuerdo a los diferentes ensayos de rutina en laboratorio, y se observa que las repeticiones de la medición de la cantidad de humedad en cada variedad no es muy variante como para realizar diez repeticiones, que frecuentemente es lo recomendable. Luego se llevan a la estufa a una temperatura alrededor de 50° C (temperatura moderada, para no afectar los metabolitos en estudio, Fig. 2.1.). Luego se determina el contenido de humedad promedio en la cáscara por diferencia de pesos, adicionalmente se

presentan las relaciones de peso de cáscara y piel (en el caso de la variedad 1) respecto al fruto.

2.2.5 Ubicación de las antocianinas en el cuerpo del fruto

Se toma un fruto entero y se le somete a extracción en frío con el solvente extractor sugerido en un comienzo, Et-OH 96°-HCl 0.1N (85:15) (Fuleki-Francis ¹³, 1968), luego de observar que el colorante tiñe la solución se toma la cáscara y la pulpa por separado y en recipientes diferentes con el mismo solvente extractor, al sumergirlos se nota claramente que el recipiente que contiene sólo la cáscara tiñe de rojo mas no la que contiene la pulpa.

Resultados.

El contenido de humedad en la cáscara, se expresa en porcentaje en peso pero la poca uniformidad entre los valores de la variedad 1, lleva a que se desarrolle rápidamente la prueba Q, que es una prueba estadística ampliamente utilizada; en ésta prueba el valor absoluto de la diferencia entre el valor dudoso y el resultado vecino se divide entre la dispersión de la serie completa para dar la cantidad Q_{exp} y ya que uno de los resultados como se puede observar en la tabla 2.1., es un tanto diferente a los otros (72.70 %), entonces se procede, primero a ordenar los valores en forma creciente, de esa manera se puede observar el menor valor dudoso, y así también se desarrolla la prueba en mención.



(b)

Fig. 2.1. (a): pesado de las cáscaras de cada una de las muestras escogidas de las tres variedades. **(b):** secado de las muestras.

Valores ordenados de manera creciente:

- 72.70
- 74.47
- 74.73
- 75.12
- 75.68
- 76.47

Por lo que para el menor valor (valor dudoso):

$$Q_{\exp(x_1)} = \frac{x_2 - x_1}{x_6 - x_1} = \frac{74.47 - 72.70}{76.47 - 72.70} = 0.47$$

De tablas se tiene que el coeficiente de rechazo:

$Q_{0.90}$ (para seis datos) = 0.56, entonces como $Q(x_1)=0.47 < 0.56$, según la prueba Q , podemos admitir éste valor en el promedio. En el caso de las otras variedades, los valores son más uniformes por lo que sólo se realiza el promedio simple de ellos.

Tabla 2.1
Contenido de humedad en cáscaras secas

Muestra de baya No.	% En peso		
	Variedad No. 1	Variedad No.2	Variedad No.3
1	75.68	90.18	88.12
2	75.12	90.61	86.38
3	72.70	90.14	86.33
4	74.73	90.52	87.61
5	74.47	90.22	86.45
6	76.47		
Promedio	74.86	90.33	86.98

La tabla 2.2. representa la proporción en peso de cáscara seca respecto del fruto completo, para tener una idea del rendimiento de cáscara seca promedio.

Tabla 2.2
Proporción de cáscara seca respecto al fruto.

Muestra de baya No.	% En peso		
	Variedad No. 1	Variedad No. 2	Variedad No. 3
1	15.49	7.58	8.65
2	15.47	7.22	9.90
3	15.42	7.54	9.87
4	15.94	7.38	8.90
5	15.74	7.60	9.50
6	15.11		
Promedio	15.53	7.46	9.36

En la tabla 2.3., tiene el papel de mostrar la proporción en peso que tiene la piel seca que cubre la cáscara respecto a la misma cáscara seca y también respecto al fruto completo, lo que se midió sólo para la variedad 1.

Tabla 2.3
Proporción de piel seca respecto a la cáscara seca y respecto al fruto completo, de la variedad 1.

% En peso de piel respecto a	
Cáscara seca	Fruto fresco (completo)
18.37	2.85

En vista que ésta planta se propaga por semilla; se desea determinar el rendimiento en el sembrado y para ello se

realiza un conteo y pesado de las semillas que hay en cada una de cinco bayas de cada variedad. Y como en éste caso los valores son algo irregulares, se aproximarán los resultados en cierto rango. Tabla 2.4.

Con el fin de mostrar el rendimiento de semillas de una baya de la variedad 1, con respecto al contenido de T Acys y a un fruto completo, se presenta la tabla 2.5, donde se muestra el peso de las semillas contenidas en función de las variables mencionadas.

Tabla 2.4.
Reporte del peso y unidades de semillas por fruto de cada una de las muestras de las tres variedades.

Muestra de baya No.	Variedad No. 1		Variedad No. 2		Variedad No. 3	
	Peso (gr./fruto)	Cantidad de semillas por fruto	Peso (gr./fruto)	Cantidad de semillas por fruto	Peso (gr./fruto)	Cantidad de semillas por fruto
1	1.4020	88	0.8256	36	1.3215	98
2	0.8603	54	0.8250	36	1.5643	116
3	0.7807	49	0.8259	36	1.5640	116
4	1.2905	81	0.9402	41	1.4159	105
5	1.3861	87	0.8485	37	1.6182	120
Rango	0.8-1.4	50-90	0.8-0.9	35-40	1.3-1.6	95-120

Tabla 2.5
Relación del peso de semillas para variedad 1

Proporción de semillas respecto a	
Fruto completo (% en peso)	Contenido de T Acys (gr/mg T Acys)
26.55	0.16

Discusión de resultados

Según los resultados de la tabla 2.1., la variedad No. 1 muestra menos humedad en la cáscara y un mejor rendimiento de la cáscara sobre el fruto, que los otros, tal vez, aparentemente, sería la más apropiada para explotarla industrialmente, ya que se conserva mejor ante los microorganismos que los otros (por observaciones durante la investigación), aunque si hablamos del tiempo de secado éste no es muy diferente, todas en un ambiente de temperatura alrededor de 40 °C (Tiempo de verano en Lima) y en campo abierto, demoran en promedio un día y medio en secarse.

En lo que respecta al rendimiento de semillas, en la tabla 2.4. se considera el peso y las unidades de semillas medidas en cada baya, puesto que la masa es una mejor herramienta en la comparación que el número de semillas, aunque se observó la uniformidad en la forma y tamaño de las mismas se considera el peso y el número de unidades en la medida de propagación de la planta, la variedad No. 3, muestra mejores expectativas y la que menos puede brindar la oportunidad de propagarse es la variedad No. 2. La Variedad No. 1, está entre ellos, lo que le da otra ventaja para su cultivo.

Sobre la tabla 2.5, se muestra un 26 % aprox. en peso de semillas que contiene una baya de la variedad 1, es decir más de la cuarta parte del peso del fruto fresco lo representa la parte del mismo que puede reproducirlo, y que en un proceso de producción del colorante se puede aprovechar gran cantidad de semillas de esta variedad.

Éstos valores resultan de muestras representativas, cultivadas en un solo lugar; en vista de que la planta es silvestre su desarrollo depende de la naturaleza del ambiente donde se desarrolla, por lo cual éstos valores pueden variar dependiendo de factores como las condiciones del suelo (humedad, pH, contenido de materia orgánica, etc.), altitud, clima, etc.

2.3 EXTRACCIÓN DE LAS ANTOCIANINAS DE LA MISHQUIPANGA

Cabe recalcar, que en adelante, se muestran resultados de los experimentos que se realizan sólo para la variedad 1, (Fig. 2.2.).

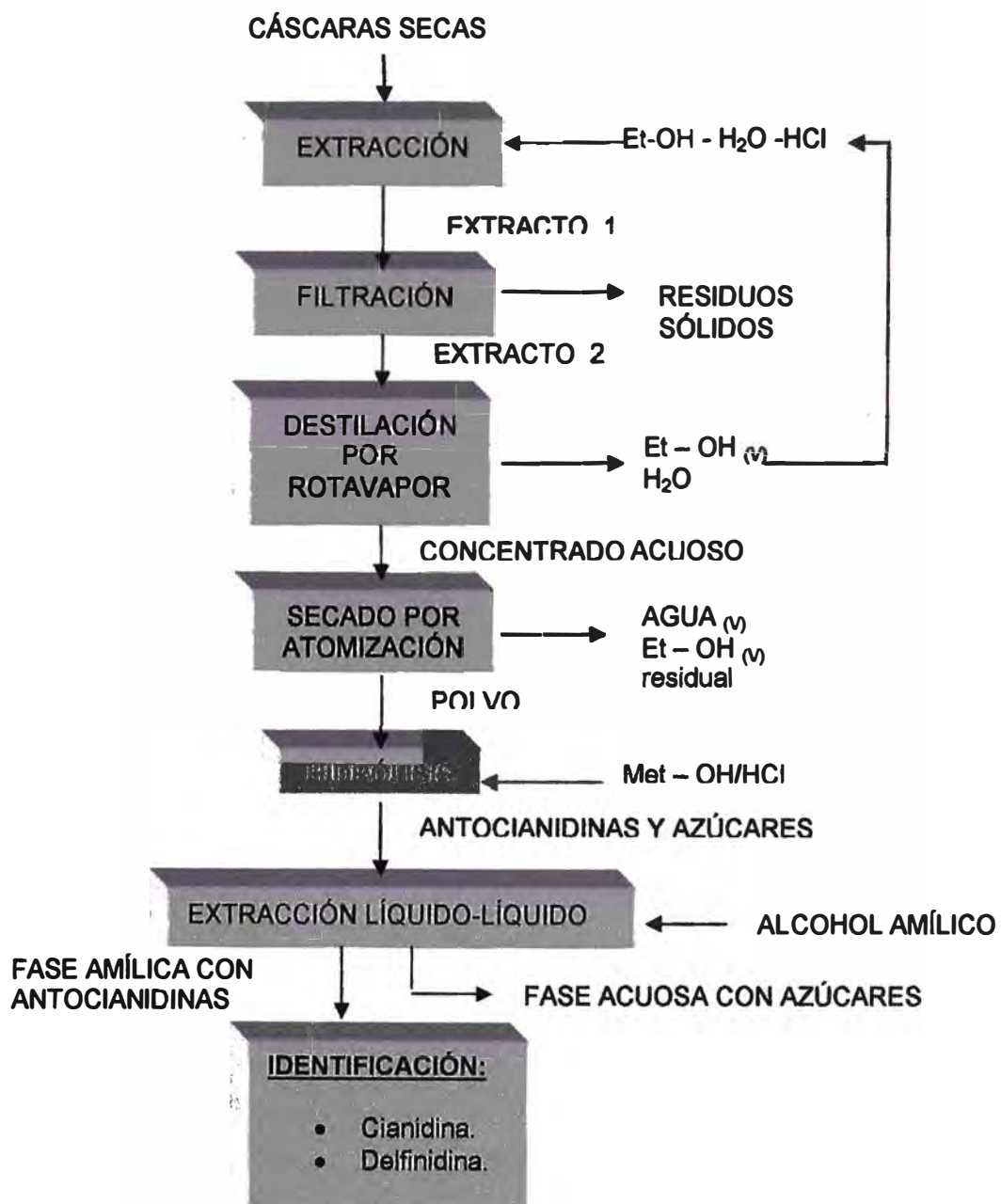


Fig. 2.2. Baya de la variedad 1.

Siendo la piel de la cáscara seca, el que contiene el analito en estudio (en vista que el endocarpio leñoso tenía escasa cantidad de colorante); si embargo, cuando el fruto está fresco, no es posible separar dicha piel de la cáscara, porque aún tiene agua almacenada y al tratar de separar se presiona y sale el agua con colorante y además por estar adherida y húmeda la piel se parte y por eso se tiene que seguir el procedimiento mencionado (primero se descascara, se seca y se separa la piel) y en adelante, por

razones prácticas, se mencionará a la piel seca como cáscara seca (c.s.). Respecto al solvente, el único que se usa es el etanol acuoso y con el cuál se sigue un tratamiento en el laboratorio, empezando por su extracción (sin agitación) y que se representa mediante un diagrama de flujo.

DIAGRAMA DE FLUJO DEL ESTUDIO DE LAS ANTOCIANINAS DE LA MISHQUIPANGA A NIVEL LABORATORIO



2.3.1. Determinación de las antocianinas totales e índice de degradación para la mishquipanga.

Procedimiento

Para determinar la cantidad de antocianinas en los diferentes extractos y concentrados estudiados de la cáscara de la mishquipanga se usa el método de pH simple y de pH diferencial (Fuleki-Francis, 1968 ¹⁴), así como para calcular el ID.

2.3.1.1 Selección del blanco

Es necesario determinar un blanco apropiado para las mediciones de la absorbancia a 510 nm (según el método de Fuleki-Francis ¹⁴ que usualmente es el medio en que se realiza la medición (para el caso los buffers de pH 1 y 4.5), pero por datos obtenidos de literaturas, si se usa agua destilada o los buffers como blanco no hay mucha diferencia en los valores correspondientes en cierto intervalo de longitud de onda, que para hacer mención sería en la región espectral de 250-650 nm, mas aún para mayor seguridad se realizan las pruebas respectivas confrontando los valores de absorbancia de cuatro muestras de extracto de mishquipanga diluidos con el buffer pH 1.0 usando como blanco agua destilada y el mismo buffer pH 1.0.

2.3.1.2 Cálculo de antocianinas totales por el método de pH diferencial

El presente ejemplo proviene de unas de las tantas pruebas que se realizaron con un lote de cáscaras secas de la variedad N°1, que contiene Acys degradadas y cierta cantidad de pigmento perdido accidentalmente, con el que

se mostrará el procedimiento de cálculo y la interpretación de los resultados.

Se pesa 2 gramos (W) de cáscara seca y se mezcla con 80.0 mL de solvente extractor (que será el volumen total de extracción, TEV), y cada dos horas se extraen dos alícuotas cada una de 0.200 mL (el volumen de muestreo, SV), una se lleva a una fiola de 25.00 mL (volumen diluido, DV) y otra a una de 5.00 mL (volumen diluido, DV) y ambas se diluyen con los buffers de pH 1.0 y pH 4.5 respectivamente, inmediatamente después de agitar se llevan ambas soluciones a viales limpios y secos, respectivamente rotulados para luego permanecer en oscuridad por un lapso de dos horas, que es periodo recomendado para que se estabilicen las antocianinas con el nuevo medio acuoso.

Terminado el lapso, se miden los pHs respectivos de cada muestra (sólo para asegurar que no hay cambios considerables en el pH con otros metabolitos extraídos de la cáscara) para luego ser llevado al análisis espectrofotométrico UV-Visible en un **UV-1601 SHIMADZU**, en donde se midieron (con agua destilada como blanco) las absorbancias a 510 nm (O.D.) y posteriormente se calcularon para cada muestra, el TOD (con la ecuación 1.2), la Δ O.D. (ecuación 1.5) y las T Acys en mg/mL y mg/g c.s.

Total Acys (mg Acys/mL extracto):

$$T O.D._{pH 1.0} = O.D. \times 25.00 \times \frac{1}{0.200}$$

$$T O.D._{pH 4.5} = O.D. \times 5.00 \times \frac{1}{0.200}$$

$$\Delta O.D. = T O.D._{pH 1.0} - T O.D._{pH 4.5}$$

$$T \text{ Acys, mg/mL extracto} = \frac{\Delta \text{ O.D.}}{77.5}$$

Total Acys (mg Acys/g c.s.):

$$T \text{ Acys, mg/g c.s.} = \frac{\Delta \text{ O.D.}}{77.5} \times \frac{\text{TEV}}{W} \text{ Siendo:}$$

W = Peso de cáscara seca de mishquipanga usada para la extracción.

2.3.1.3 Cálculo de antocianinas totales por el método de pH simple

Del experimento anterior:

Total Acys (mg Acys/mL extracto):

$$T \text{ O.D.}_{\text{pH } 1.0} = \text{O.D.} \times 25.00 \times \frac{1}{0.200}$$

$$T \text{ Acys, mg/mL extracto} = \frac{T \text{ O.D.}_{\text{pH } 1.0}}{87.3}$$

Total Acys (mg Acys/g c.s.):

$$T \text{ Acys, mg/g c.s.} = \frac{T \text{ O.D.}_{\text{pH } 1.0}}{87.3} \times \frac{\text{TEV}}{W}$$

2.3.1.4 Cálculo del índice de degradación.

De los datos anteriores:

$$ID = \frac{T \text{ Acys, mg / ml extracto (método simple)}}{T \text{ Acys, mg / ml extracto (método de pH diferencial)}}$$

Resultados.

2.3.1.5 Determinación del blanco.

La tabla 2.6. muestra las absorbancias medidas de las cuatro muestras, con agua destilada y el buffer pH=1.0 como blanco.

Tabla 2.6
Absorbancias medidas con agua y búffer como blancos.

# Muestra	OD a $\lambda = 510 \text{ nm}$	
	Buffer pH = 1.0	Agua destilada
1	0.278	0.278
2	0.282	0.282
3	0.285	0.286
4	0.275	0.276

2.3.1.6 Cálculo de antocianinas totales por el método de pH diferencial.

Se tienen dos muestras por cada dos horas uno a pH 1.0 y el otro a pH 4.5 y la prueba duró 10 horas, lo que da en total 10 resultados, la tabla 2.7. reporta los pHs medidos de las cinco muestras disueltas en cada buffer.

Tabla 2.7
Comprobación de pHs en diluciones con búffer pH 1.0 y 4.5.

Tiempo (hr)	pH medido	
	Buffer pH = 1.0	Buffer pH = 4.5
2	0.97	4.49
4	0.97	4.45
6	0.97	4.44
8	0.97	4.45
10	0.98	4.45

La tabla 2.8., muestra los OD y TOD medidos de las cinco muestras disueltos en buffers pH 1.0 y 4.5.

Tabla 2.8.
Resultados de las medidas de OD y TOD de las muestras a pH 1.0 y 4.5.

Tiempo (hr)	pH = 1.0		pH = 4.5	
	O.D.	T O.D.	O.D.	T O.D.
2	0.0646	8.08	0.0463	1.16
4	0.0839	10.49	0.0852	2.13
6	0.1040	13.00	0.1039	2.60
8	0.1066	13.33	0.0939	2.35
10	0.1140	14.25	0.1060	2.65

Y la tabla 2.9. se tienen los resultados del cálculo de T Acys por el método de pH diferencial en mg de Acys/mL y mg de Acys/g c.s.

Tabla 2.9
Resultados del cálculo de T Acys, con el método de pH diferencial.

Tiempo (hr)	ΔT O.D.	T Acys (mg/mL)	T Acys (mg/g c.s.)
2	6.92	0.089	3.57
4	8.36	0.108	4.31
6	10.40	0.134	5.37
8	10.98	0.142	5.67
10	11.60	0.150	5.99

2.3.1.7 Cálculo de antocianinas totales por el método de pH simple

Se tienen los resultados del cálculo de TOD a pH 1.0 y de T Acys por el método de pH Simple en mg de Acys/mL y mg de Acys/g c.s. (Tabla 2.10.).

Tabla 2.10

Resultados del cálculo de T Acys, con el método de pH simple.

Tiempo (hr)	T O.D. pH 1.0	T Acys (mg/mL)	T Acys (mg/g c.s.)
2	8.08	0.092	3.70
4	10.49	0.120	4.81
6	13.00	0.149	5.96
8	13.33	0.153	6.11
10	14.25	0.163	6.53

2.3.1.8 Cálculo del índice de degradación.

Tabla 2.11.

Resultados del cálculo del ID, de las cinco muestras.

Tiempo (hr)	ID
2	1.04
4	1.11
6	1.11
8	1.08
10	1.09

Discusión de resultados

En lo que respecta al blanco, el agua o los buffers reportan O.D. casi idénticos (tabla 2.6.), lo que lleva a usar agua destilada como blanco para las mediciones de absorbancia en la determinación de Acys. Las mediciones del pH muestran todos sus valores correspondientes alrededor de 1.0 y 4.5 (tabla 2.7.), lo que permite llevarlos con toda seguridad a la medición de absorbancia (O.D.), en donde se observa un aumento gradual que es de extracción de antocianinas a medida que avanza el tiempo. También se puede observar que los valores de las T Acys del método simple (tabla 2.10.) son mayores que los calculados por el método diferencial (tabla 2.9.), esto es porque en el método de pH simple la absorbancia medida a 510 nm no sólo la dan las Acys sino algunas trazas de compuestos fenólicos parduscos, que son producto de la degradación de Acys durante un almacenamiento prolongado o exposición prolongada en altas temperaturas.

Ahora como reportó Fuleki-Francis¹⁴, al cambiar el pH, el O.D. de las Acys cambia mas no la de los productos de degradación, entonces al restarle el O.D. a pH 4.5 se les está restando la absorbancia de dichos compuestos fenólicos parduscos.

Como consecuencia, de que las T Acys del método simple son mayores que las del método diferencial, entonces el índice de degradación, resulta mayor que uno y en promedio están alrededor de 1.1 (tabla 2.11.). Lo cuál nos indica que hay productos de degradación, y que la cantidad de Acys neta que se encuentra en el extracto es la calculada por el método de pH diferencial.

2.3.2 Efecto del pH.

Procedimiento

Para evaluar el efecto del pH en la extracción se realizan pruebas, con soluciones extractoras de diferentes pHs dejando los demás factores importantes constantes: composición de solvente, temperatura, tiempo de extracción y relación solvente/cáscara. A comparación de la evaluación de composición de solvente los diferentes pHs fueron obtenidos con menos complejidad, ya que para la relación que usó Fuleki-Francis ¹³, que fue 85:15 (Etanol 96° : HCl 1.5N) el pH medido resultaba alrededor de 1.0, entonces bastaba con subir y bajar las concentraciones del HCl acuoso y medir los pHs de las soluciones resultantes, dejando, claro está, dicha relación constante.

Por ejemplo, en 100 mL de solución, 85 mL son de Etanol 96° y 15 mL son de una solución de HCl acuoso que puede ser de 3N, esto baja el pH de la solución resultante a un valor de 0.6, y así la Tabla 2.12., muestra el resultado de los pHs medidos de las diferentes soluciones extractoras a diferentes cambios de concentración de HCl a usar.

Tabla 2.12.

pHs medidos de soluciones extractoras para diferentes concentraciones de HCl.

Normalidad De HCl	pH De La Solución Extractora Resultante
3.0	0.50
1.5	0.97
0.5	1.45
0.1	2.17

Resultados

Se evalúa el efecto del pH en la extracción teniendo en cuenta:

Solvente: 81.6 % de Etanol acuoso en medio ácido

Ácido: HCl

pH Evaluados: 0.5, 0.97, 1.40, 2.10

Tiempo de extracción: 4 hr

Temperatura: 20 ° C

Relación Solvente/Cáscara (mL/g): 60.

Tabla 2.13

Antocianinas extraídas a diferentes pHs.

pH	T Acys (mg/mL)	T Acys (mg/g c.s.)
0.50	0.0978	5.87
0.97	0.1340	8.02
1.40	0.1250	7.47
2.10	0.0679	4.08

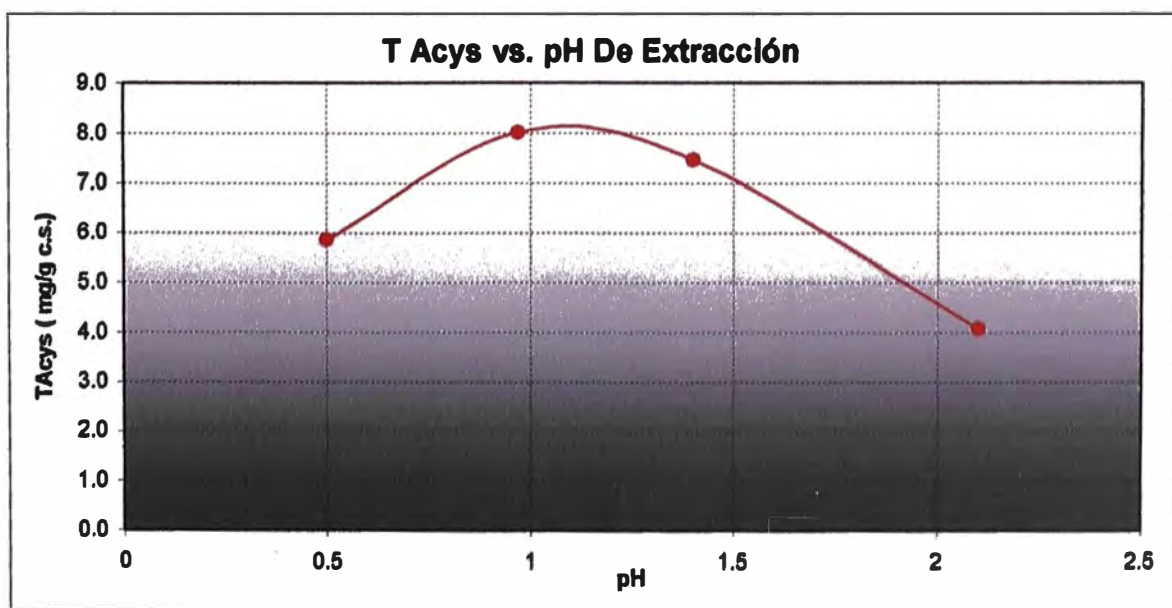


Fig. 2.3. Efecto del pH en la extracción de T Acys.

Discusión de resultados

De la Fig. 2.3. se puede observar que el pH más favorable para la extracción está alrededor de 1, esto está de acuerdo con la información sobre el comportamiento químico de las antocianinas en medio ácido, su naturaleza oxonio las hace más solubles en soluciones de ácidos fuertes (HCl para este caso) en medios acuosos debido a la competencia que se establece entre las moléculas de antocianinas y las de agua para capturar el protón proveniente del ácido fuerte. Esta es una herramienta de gran importancia para un estudio a nivel planta piloto sobre la producción industrial del colorante.

2.3.3 Efecto de la composición de solvente.

Procedimiento

Se refiere al contenido de agua-alcohol como solvente extractor, con el que se determina un gráfico que muestra la cantidad de antocianinas que extraen diferentes relaciones de etanol en agua, manteniendo los demás parámetros que afectan (en gran manera) el desarrollo de la extracción, constantes, como la temperatura, el pH de la solución extractora, el tiempo de extracción y la relación solvente/cáscara.

Así, primero se tiene que hacer el cálculo de las diferentes concentraciones de HCl acuoso que se mezclarán con alcohol rectificado, en diferentes proporciones para dar diferentes porcentajes de alcohol en agua, manteniendo el pH de la solución final constante.

En vista que la relación 85:15 (Etanol 96° : HCl 1.5N), da un pH final de aprox. 1, se escoge éste valor como pH constante y se realiza un balance de masa de la cantidad de HCl_(g) en ésta solución y en las relaciones nuevas escogidas

de Etanol de 96° : HCl X N, para hallar la concentración X N que debe tener el HCl acuoso. Tabla 2.14.

Por ejemplo, para una relación 55 : 45, en una solución de 100 mL, 55 mL son de Etanol de 96° y 45 mL de una solución acuosa de HCl X N, entonces, por balance de masa del HCl (g):

$$\frac{15\text{ml}}{100\text{ml}} \times 1.5\text{N} = \frac{45\text{ml}}{100\text{ml}} \times X$$

De ésta manera la cantidad de HCl (g) se mantiene constante y por consecuencia el pH también y con el mismo principio se calcularon las otras concentraciones correspondientes del HCl acuoso.

Tabla 2.14.

Relación de las diferentes concentraciones de HCl que deben tener las soluciones extractoras, para no cambiar el pH, pero para variar los porcentajes de etanol en agua.

Relación Et-OH 96° : HCl X N	Concentración De HCl acuoso (X N)	pH medido de la solución extractora
95 : 5	4.50	0.85
85 : 15	1.50	1.08
75 : 25	0.90	1.05
65 : 35	0.60	1.08
55 : 45	0.50	1.02
45 : 55	0.40	0.95
35 : 65	0.35	0.94

Resultados

El comportamiento de la extracción a diferentes proporciones de etanol-agua en el solvente, se realiza con éstas condiciones:

Solvente: Etanol acuoso en medio ácido.

Ácido: HCl.

pH: 0.97

Tiempo de extracción: 1 hr

Temperatura: 20 ° C.

Relación Solvente/Cáscara (mL/g): 50.

Tabla 2.15
Antocianinas extraídas a diferentes
proporciones de etanol:agua en el solvente

% de Alcohol	T Acys (mg/mL)	T Acys (mg/g c.s.)
9.60	0.240	12.0
24.0	0.259	12.9
33.6	0.316	15.8
43.2	0.362	18.1
52.8	0.372	18.6
62.4	0.376	18.8
72.0	0.370	18.5
81.6	0.220	11.0
91.2	0.122	6.09

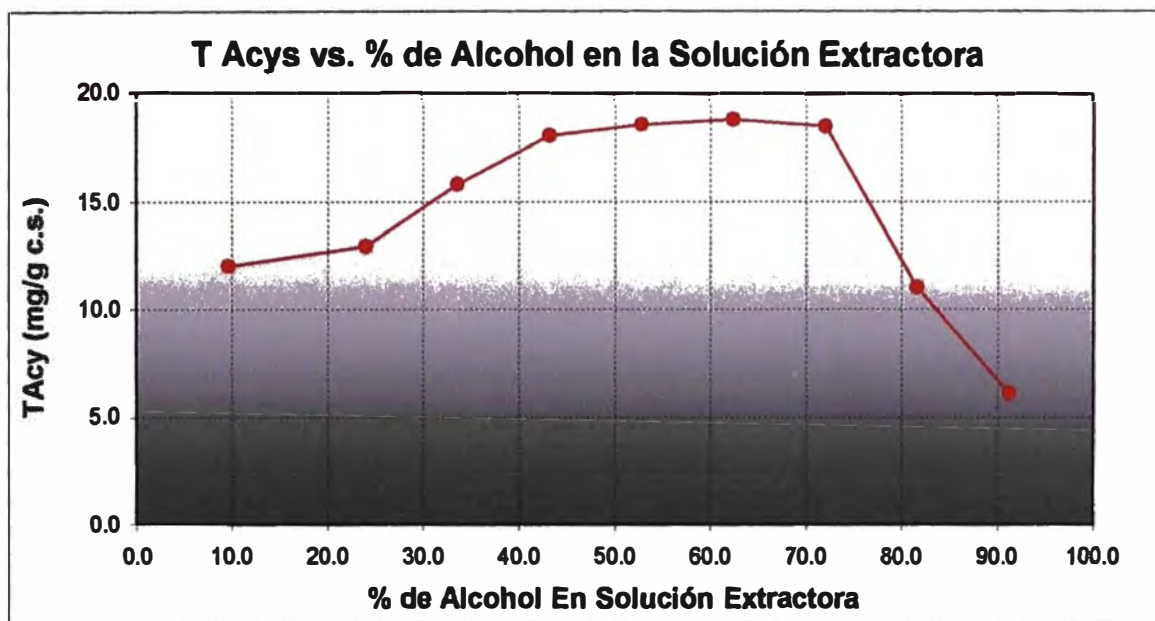


Fig. 2.4. Efecto del porcentaje de alcohol en la extracción.

Discusión de resultados

En la Fig. 2.4. se puede observar el importante efecto de la proporción de etanol en la solución extractora, para la obtención de las antocianinas, que representa la zona de 45 % hasta 70 % aproximadamente que es donde se extrae la mayor cantidad de antocianinas respecto a las obtenidas con las otras soluciones de distintas relaciones de Et-OH : H₂O. Además se puede observar que el agua pura extrae más que etanol puro, y que una relación promedio de 60% de etanol en agua extrae más que el etanol y el agua, esto tal vez se deba a la polaridad de las antocianinas y la presencia del agua en una proporción de no menos del 40 %, debe faltar por ser más polar que el etanol. De ésta manera se puede sustentar que no es necesario utilizar gran proporción de etanol en una solución extractora, como aún lo hacen en investigaciones, como por ejemplo, Fuleki – Francis ¹³ usaron una solución extractora de Et-OH 96° - HCl 1.5N (85:15), además como consecuencia si se analiza desde el

punto de vista económico, entre usar más etanol o más agua la elección lógica sería el agua, por ser de más bajo costo.

2.3.4 Efecto de la temperatura.

Procedimiento

Para la extracción de productos agroindustriales es cotidiano el estudio del efecto de la temperatura durante una extracción. El fenómeno de la relación de la solubilidad con la temperatura es bien conocido y para estudios de extracción sólido-líquido la transferencia de masa es en muchos casos más favorable a altas temperaturas, debido a las siguientes características que se producen:

- La solubilidad se incrementa.
- La viscosidad disminuye.
- La difusión incrementa.

Para poder evaluar los efectos a temperaturas altas, es necesario realizar previos ensayos sobre la degradación de las antocianinas en dichas condiciones, para lo cual se eligieron las siguientes temperaturas de extracción: 5°C, 20°C, 50°C, 70°C. Manteniendo los otros principales parámetros constantes.

Para 5°C, el solvente extractor se lleva al congelador y se mantiene allí por unas doce horas para que la temperatura en el sistema se uniformice, y el ensayo empieza al agregar las cáscaras pesadas. Para las temperaturas de 50 y 70 °C, es necesario, realizar una prueba previa de dos horas de extracción a 70 °C y calcular el índice de degradación, de acuerdo con esos resultados se procedió a tomar el método simple para determinar Acys totales. Además éste experimento muestra el tiempo en que se extraen todas las Acys y que fue una herramienta importante para tomar un

tiempo de extracción, que será el mismo para los cuatro casos.

Resultados.

Para ésta evaluación se toma en cuenta que, por ensayos de rutina, a 70°C, gran parte del pigmento se extrae alrededor de 20 minutos, siendo ese valor, el que determinaría el tiempo de extracción.

Solvente: 62.4 % de Etanol acuoso en medio ácido

Ácido: HCl

pH: 0.95

Tiempo de extracción: 20 min.

Temperaturas evaluadas: 5, 20, 50, 70 ° C.

Relación Solvente/Cáscara (mL/g): 50.

Tabla 2.16

Antocianinas extraídas a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	T Acys (mg/mL)	T Acys (mg/g c.s.)
5	0.113	5.66
25	0.281	14.1
50	0.461	23.0
70	0.746	37.3

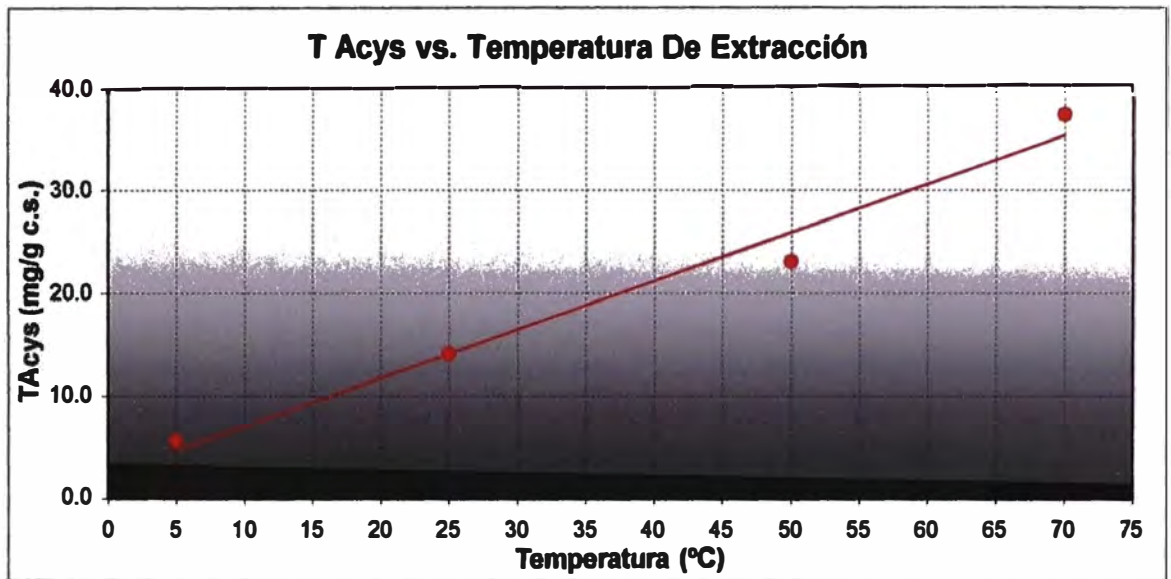


Fig. 2.5. Efecto de la temperatura durante la extracción.

Discusión de resultados

Los resultados mostrados por la Fig. 2.5. son consecuentes al hecho que se refiere al incremento de extracción con el aumento de la temperatura, sin embargo, es también necesario evaluar el ID ya que el problema común por el que no se usan éstas condiciones en materias primas vegetales o animales es la degradación de los compuestos químicos importantes que se desean lixiviar o la extracción de otros metabolitos que acompañan a las antocianinas.

2.3.5 Efecto de la relación solvente/cáscara.

Procedimiento

Una vez determinado el porcentaje de etanol y el pH de la solución extractora, se procede a analizar la variación de la relación solvente/cáscara y el efecto que tiene en la extracción de Acys. Al inicio de esta evaluación, se toma la temperatura ambiente (20 °C) como temperatura de extracción, pero los resultados muestran que el proceso es

muy lento, como se puede observar en la Fig. 2.6., entonces el hecho de que demore días y aun usando una relación Solvente/Cáscara tan alta como 60, se decide elevar la temperatura de extracción siendo las escogidas para el presente estudio las temperaturas de 50 y 70 °C.

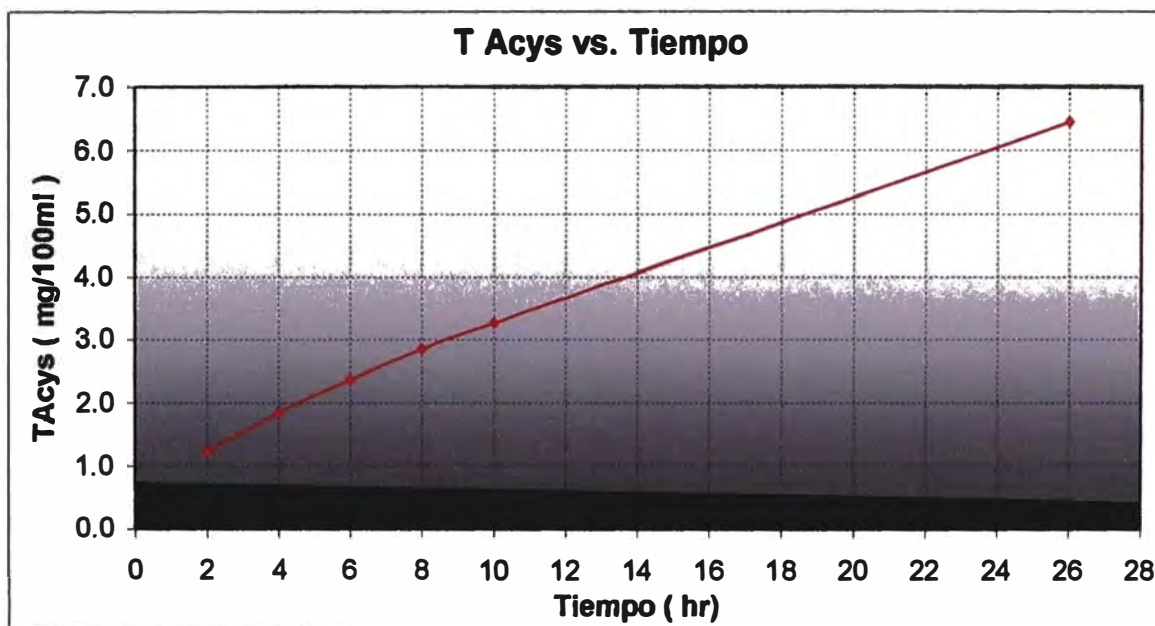


Fig. 2.6. Extracción de T Acys a temperatura ambiente (20°C), relación Solvente/Cáscara=60, pH = 1.0, solución extractora: Etanol 96%: HCl 1.5N (85:15).

Resultados

El estudio del efecto de la relación solvente/cáscara, en primer lugar, depende del tiempo pero para ésta evaluación es importante relacionar las temperaturas juntos con los tiempos de extracción, puesto que la temperatura ambiente no favorecía el rendimiento de la extracción, por ejemplo, el tiempo para llegar a extraer alrededor de un 46% en peso del pigmento es de 76 horas aproximadamente, lo que conduce a obtener gráficas de Relación solvente/cáscara vs. Tiempo a las temperaturas de 50 ° C y, en vista que la temperatura de ebullición aprox. del etanol es 78.5 ° C a 1

atmósfera de presión, entonces se elige una segunda temperatura alta moderada de 70 °C.

En ésta etapa de la investigación, es también necesario evaluar el comportamiento del ID durante la extracción y sólo para la temperatura de 70°C, puesto que si el pigmento no se degrada en ésta temperatura no es necesario observarlo durante el proceso a 50°C. También cabe mencionar que junto a cada gráfica va una de Velocidad de extracción de antocianinas (V Acys, en mg/min*g c.s.) vs. el tiempo transcurrido, con el fin de observar el impacto del tiempo en la velocidad de extracción, que como es lógico se espera que disminuya.

2.3.5.1. Temperatura de 70 °C.

A.- Relación solvente/cáscara (mL/g): 30 y determinación del ID

Solvente: 62.4 % de Etanol acuoso en medio ácido

pH Solución Extractora: 0.97

Ácido: HCl

Tabla 2.17.
Avance de la extracción a 70 °C

Tiempo (min.)	T Acys (mg/mL)	T Acys (mg/g c.s.)	V Acys (mg/min*g c.s.)	% Extracción
10	0.864	25.9	2.59	55.9
20	1.14	34.2	1.71	73.8
30	1.33	39.9	1.33	86.1
40	1.41	42.1	1.05	90.9
50	1.48	44.4	0.89	95.8
60	1.40	42.0	0.70	90.6
70	1.47	44.0	0.63	94.9
80	1.43	42.8	0.53	92.3
90	1.54	46.2	0.51	99.6
100	1.52	45.5	0.46	98.3
110	1.55	46.3	0.42	100

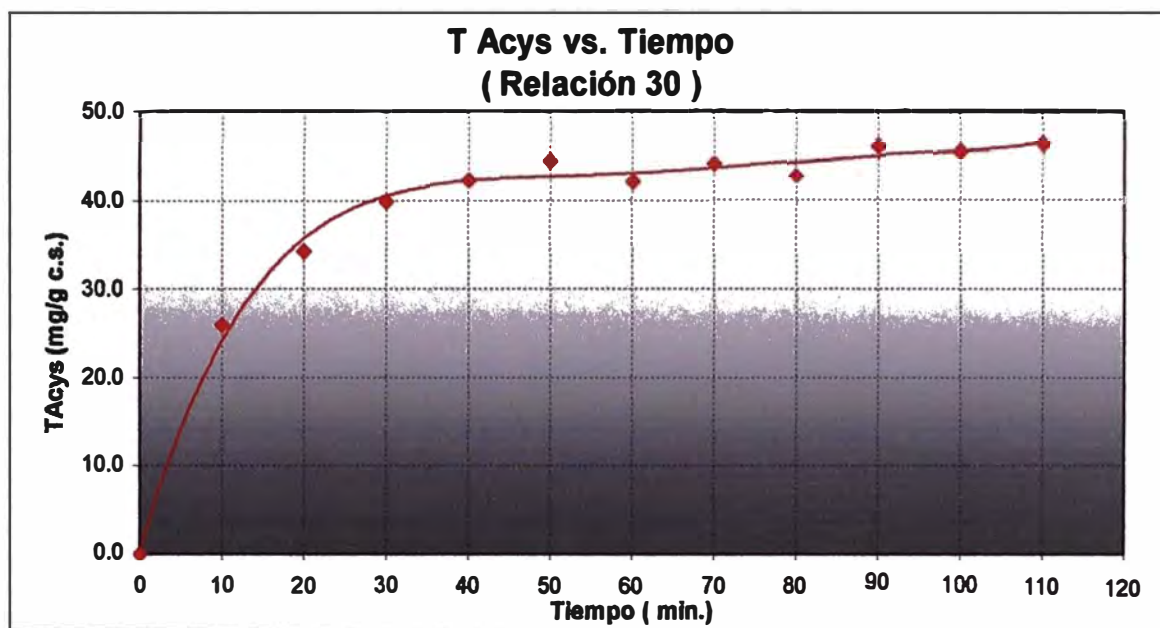


Fig. 2.7. Extracción de T Acys con una relación Solvente/Cáscara= 30, a 70°C.

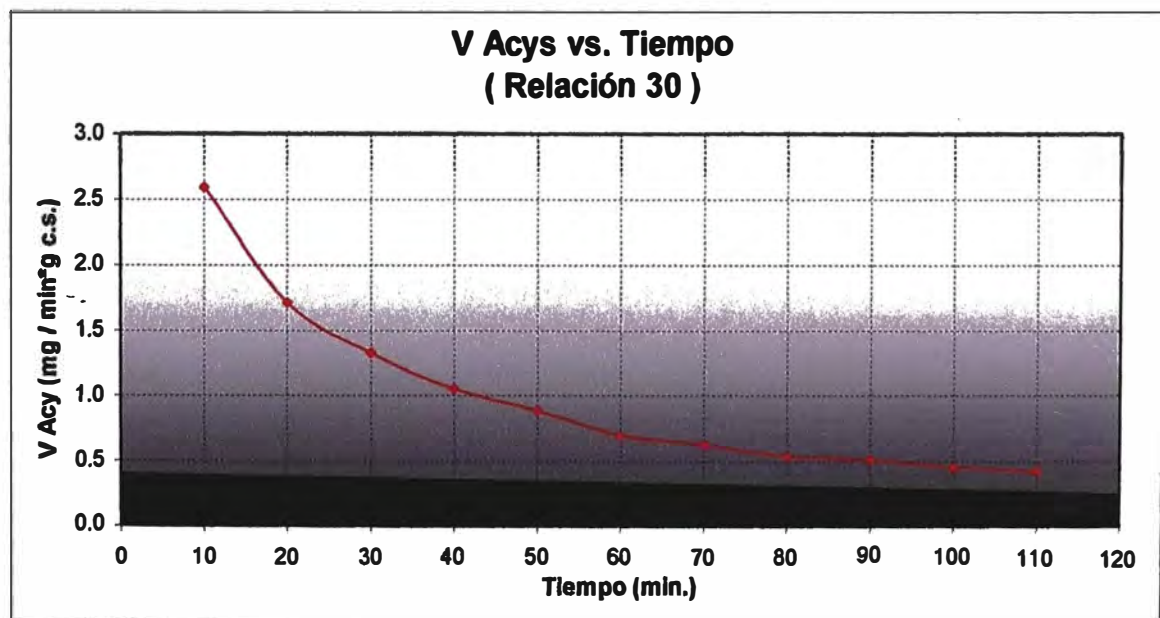


Fig. 2.8. Velocidad de extracción en mg de T Acys/min respecto del tiempo.

ID vs. tiempo de extracción**Solvente:** 62.4 % de Etanol acuoso en medio ácido**Ácido:** HCl**Relación Solvente/Cáscara (mL/g):** 30**pH Solución Extractora:** 0.97**Tabla 2.18.**
ID con un muestreo de cada 15 min.

Tiempo (min.)	ID
15	0.96
30	0.97
45	0.97
60	0.96
75	0.98
90	0.97
105	0.98
120	0.97

B. Relación solvente/cáscara (mL/g): 30, 50, 70 y 90**Solvente:** 62.4 % de Etanol acuoso en medio ácido**Ácido:** HCl**pH Solución Extractora:** 0.97**Tabla 2.19.**
Cantidades extraídas de T Acys a diferentes relaciones solvente/cáscara

Tiempo (min.)	T Acys (mg/g c.s.)			
	Relación Solvente/Cáscara			
	30	50	70	90
0	0	0	0	0
10	25.9	30.4	29.6	29.7
20	34.2	37.3	41.4	39.3
30	39.9	40.4	45.4	45.1
120	46.3 ⁱ	47.6	48.0	47.0

ⁱ Este dato fue tomado de la tabla 2.17 a 110 min., considerando que la diferencia de extracción desde 90 minutos en adelante era casi nula y que los tiempos son cercanos.

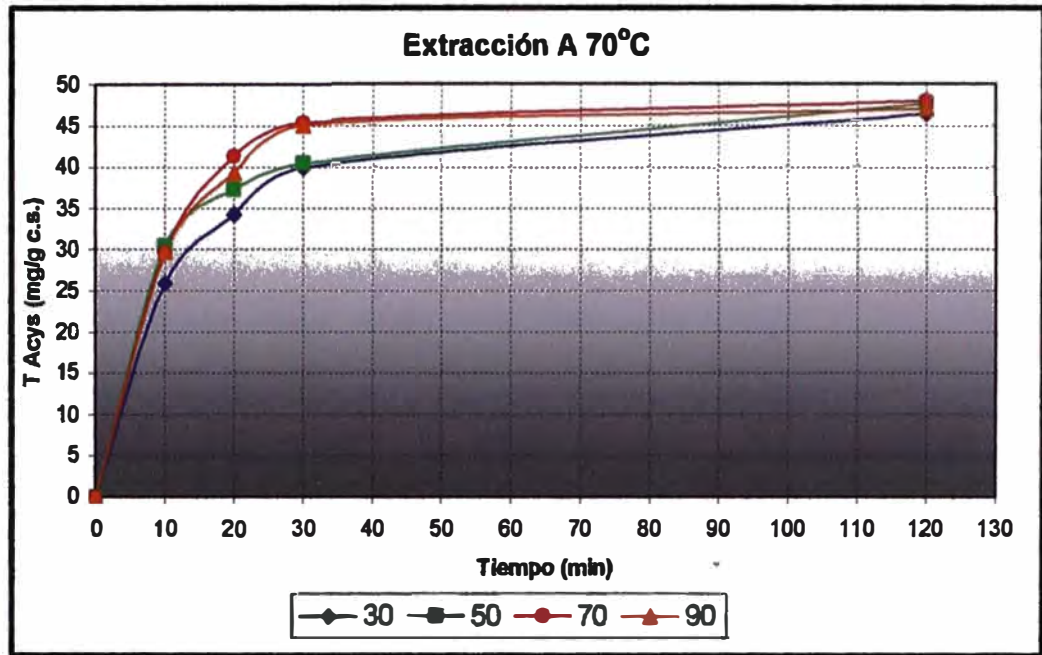


Fig. 2.9. Extracción a 70°C, con diferentes relaciones Solvente/Cáscara durante dos horas.

C. T Acys (mg/g c.s.) vs. solvente/cáscara a los 20 y 30 min.

Tabla 2.20.

Cantidades extraídas de T Acys a los 20 y 30 min. de empezada la extracción.

Solvente/Cáscara	T Acys (mg/g c.s.)	
	20 min	30 min
30	34.2	39.9
50	37.3	40.4
70	41.4	45.4
90	39.3	45.1

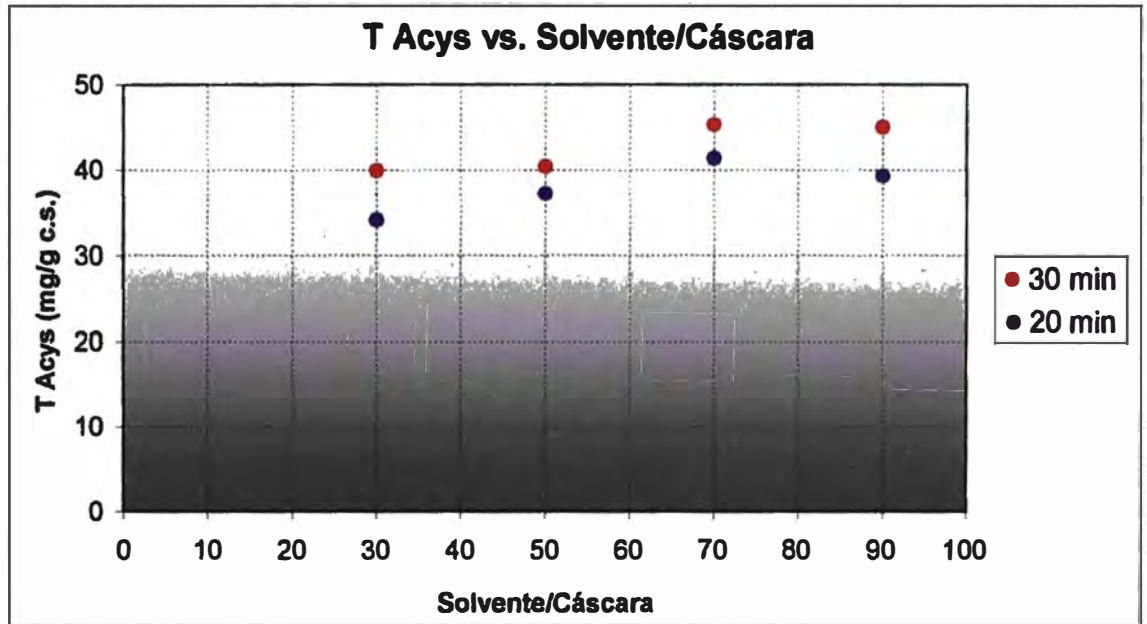


Fig. 2.10. Extracciones a 20 y 30 min de diferentes relaciones Solvente/Cáscara.

Discusión de resultados

Respecto al ID, éste claramente se muestra invariable, ya que sus valores son todos aproximadamente 1 (tabla 2.18), lo que muestra la resistencia a la degradación de las Acys a la temperatura de 70 °C, por un lapso de dos horas, dicho tiempo es suficiente para la extracción de antocianinas de la cáscara, como se ve en la Fig. 2.9.

En todas las relaciones solvente/cáscara, la velocidad de extracción (mg/min.*g c.s.) tiene una caída significativamente a los 30 minutos de iniciada la extracción, pero la extracción de T Acys es más significativa (Fig. 2.9.) y aunque siga aumentando, la diferencia no es significativa por lo que no valdría la pena esperar por una diferencia insignificante de colorante extraído, esta observación nos lleva al estudio del comportamiento de las cantidades extraídas de T Acys vs. las relaciones solvente/cáscara, a dicho tiempo de extracción (30 min.) y a 20 min.

Con la Fig. 2.10., se observa el aumento de extracción de T Acys con la relación solvente/cáscara, mas en las relaciones 70 y 90, se nota una invariabilidad en la extracción (más notoria a los 30 min), lo que nos dice que al parecer lo más adecuado sería usar una relación entre 70 y 90. Aunque la extracción parece alta entre 70 y 90 a los 30 min., esto podría mejorarse si se usaran más etapas, hasta puede ser que no sea necesario una temperatura tan alta, sino tal vez la de 50 °C.

2.3.5.2 Temperatura de 50 °C.

A.- Relación solvente/cáscara (mL/g): 50

Solvente: 62.4 % de Etanol en medio ácido

pH Solución Extractora: 1.0

Ácido: HCl

Tabla 2.21.

Avance de la extracción a 50 °C.

Tiempo (min.)	T Acys (mg/mL)	T Acys (mg/g c.s.)	V Acys (mg/min*g c.s.)	% Extracción
20	0.503	25.1	1.26	47.8
40	0.714	35.7	0.89	68.0
60	0.831	41.5	0.69	79.0
80	0.941	47.0	0.59	89.5
100	1.04	51.8	0.52	98.7
120	1.03	51.7	0.43	98.5
140	1.05	52.5	0.37	100.0
160	1.04	52.2	0.33	99.4

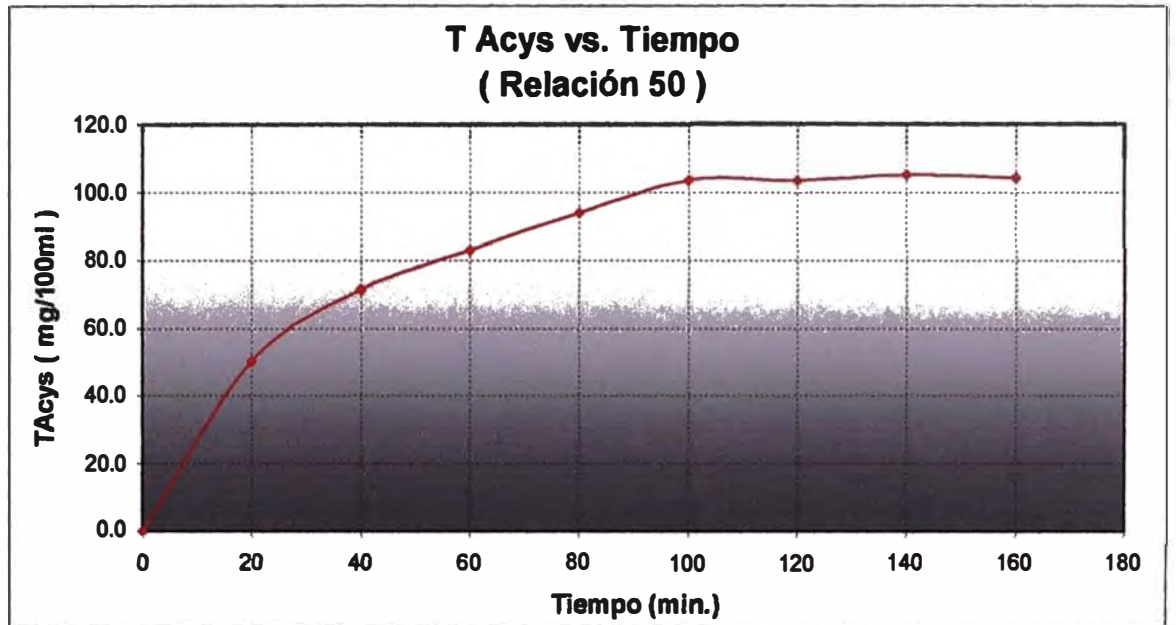


Fig. 2.11. Extracción de T Acys con una relación Solvente/Cáscara = 50, a 50°C.

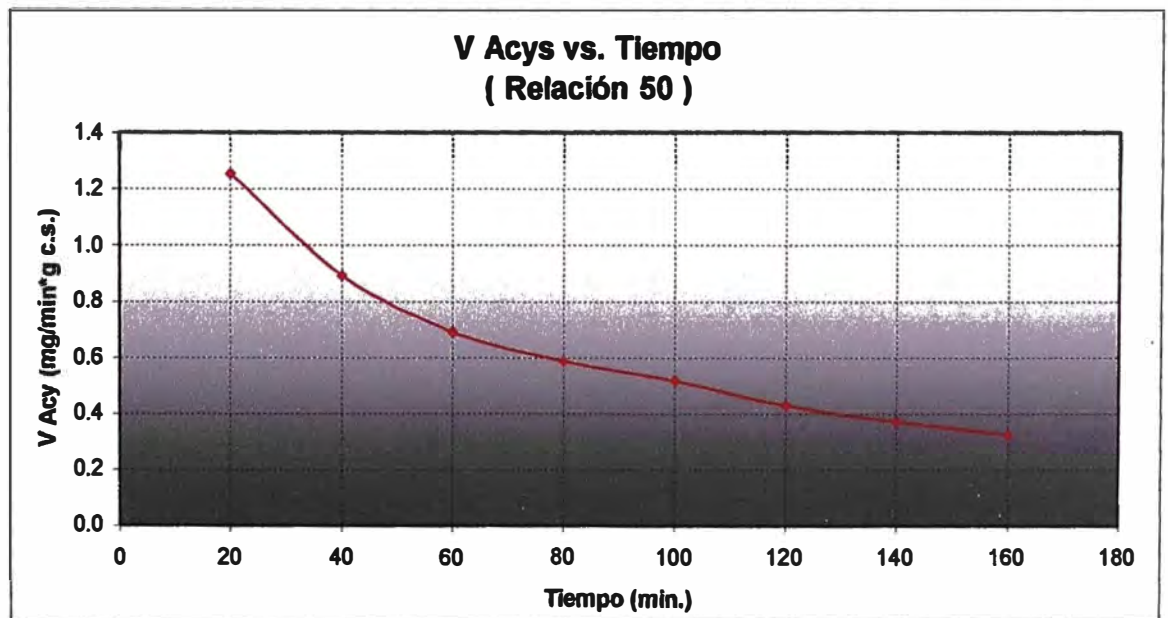


Fig. 2.12. Velocidad de extracción en mg de T Acys/min respecto del tiempo.

B.- Relación solvente/cáscara (mL/g): 30, 50, 70, 90 y 140

Tabla 2.22

Avance de la extracción a diferentes relaciones solvente/cáscara

Tiempo (min.)	T Acys (mg/g c.s.) Relación Solvente/Cáscara				
	30	50 ⁱ	70	90	140
0	0	0	0	0	0
40	36.5	39.4	40.6	40.7	44.3
120	50.1	54.4	54.7	55.7	54.7
160	54.9	55.3	55.2	55.1	55.5

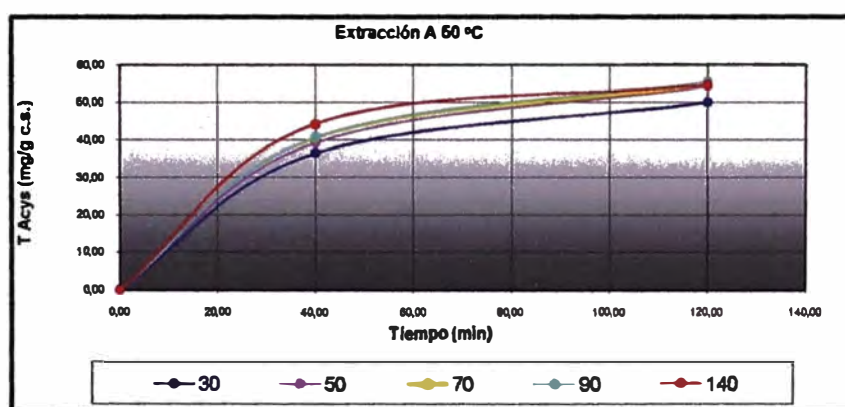


Fig. 2.13. Extracción a 50°C, con diferentes relaciones Solvente/Cáscara durante dos horas.

C.- T Acys (mg/g c.s.) vs. solvente/cáscara a los 40 min.

La presente evaluación muestra el comportamiento en la extracción de Acys con el aumento de la relación solvente/cáscara, para un tiempo determinado, el cuál se elige tomando en cuenta la velocidad de extracción, que no

ⁱ Estos valores no coinciden con los respectivos de la tabla 2.21., ya que son un promedio de más repeticiones que se hicieron.

sea muy baja, entonces el tiempo adecuado puede ser de 40 minutos.

Tabla 2.23.
Cantidades extraídas de T Acys a los 40 min. de empezada la extracción.

Solvente/Cáscara	T Acys (mg/g c.s.)
30	36.5
50	39.4
70	40.6
90	40.7
140	44.3

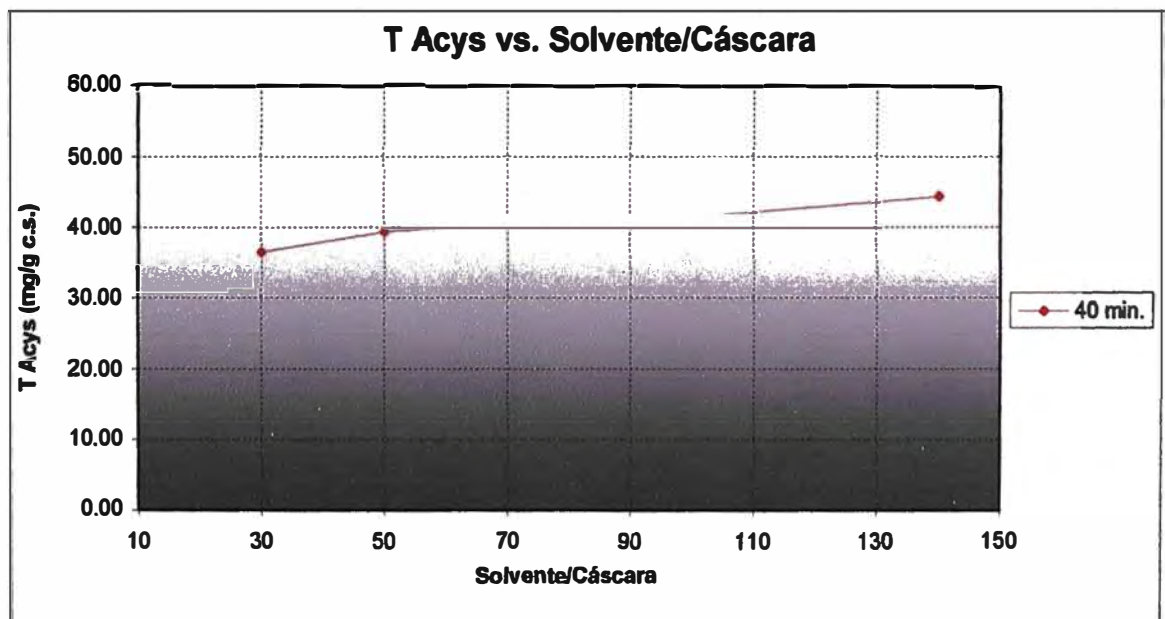


Fig. 2.14. Extracciones a 40 min de diferentes relaciones Solvente/Cáscara.

Discusión de resultados

Aunque la extracción es más lenta como se puede observar en la Fig. 2.11., pero es necesario reportar su comportamiento, debido a que éste proceso podría

mejorarse con otros factores como agitación, múltiples etapas, etc.

A los 100 minutos de comenzada la extracción es donde se obtiene una proporción (%) bien alta de extracción (99.6% para la relación de 50), pero si se observa la Fig. 2.12., la velocidad de extracción comienza a ser ínfima a los 60 minutos (y no hay diferencia importante en las siguientes), aún así es pequeña respecto a la de 40 min., por lo que es éste último tiempo que se elige para desarrollar el comportamiento de las diferentes cantidades extraídas de T Acys vs. las relaciones solvente/cáscara.

En las Figuras 2.13. y 2.14. se remarca la lentitud de ésta temperatura, al notar que usando una relación como 140 se puede extraer más rápido, claro que la lentitud es respecto a la extracción de 70 °C, ya que aún ésta temperatura de 50°C hace más eficiente la extracción que a la temperatura ambiente.

2.4 CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS.

Procedimiento.

Después del estudio de la extracción y los factores que influyen en su rendimiento, es conveniente un proceso de concentración y recuperación del solvente orgánico para reutilizarlo en las posteriores extracciones, para lo cual se estudia el comportamiento del ID antes y después de la concentración a presión atmosférica, para poder evaluar si es necesaria una operación en vacío, en caso de que haya un aumento considerable en el ID.

Para ello se usa el concentrador-destilador de la Fig. 2.15. que consiste en un calentador de baño maría (Yamato Water Bath BM-42), un Rota-Vapor (Rotary Evaporator RE-46) con graduación de revoluciones, escalado del 1-10 y un sistema de enfriamiento en

serpentín, además en éste equipo se puede anexar un sistema de vacío.

Resultados.

Se toma en cuenta algunas propiedades físicas y se miden otros parámetros con el fin de poder observar los cambios después de la operación.

Tabla 2.24

Condiciones del extracto a concentrar

Densidad (g/mL)	0.9105
Proporción de sólidos (% en peso)	0.92
Proporción de Etanol (% en volumen)	62.4
Proporción de Etanol (% en peso)	55
Volumen (mL)	300.0
Contenido de T Acys (mg)	118.6
ID	1.01

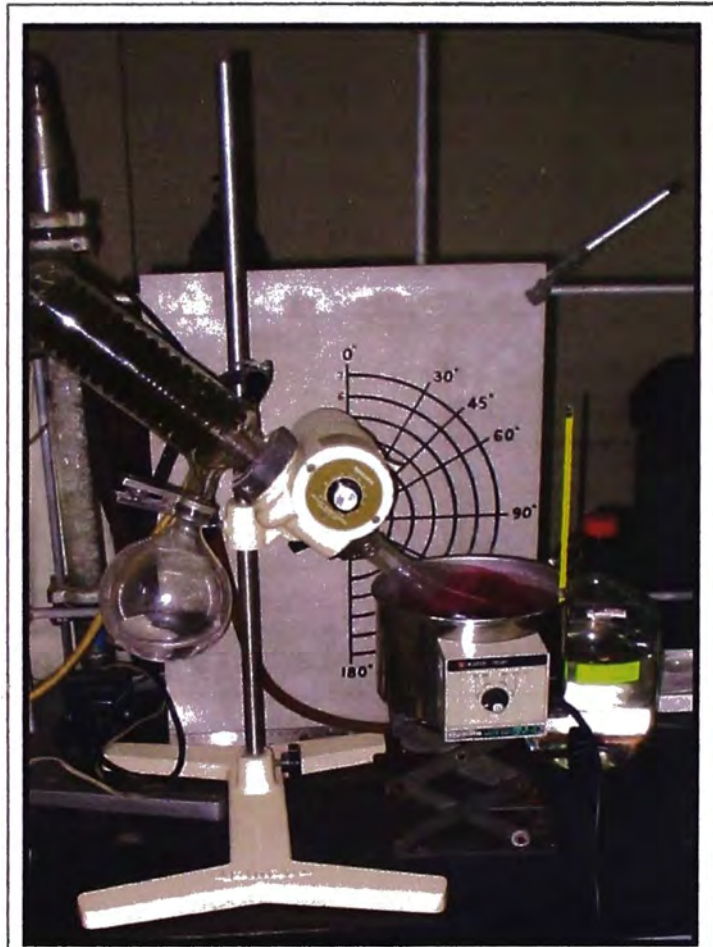


Fig. 2.15. Equipo de Destilación-Rotavapor de laboratorio.

Con la ayuda de un calentador de baño maría se llega a la temperatura de ebullición de la solución, con una temperatura de baño de 90 °C en los primeros instantes y ebullición constante durante todo el proceso. El tiempo de destilación varía de acuerdo a la cantidad que vas a concentrar; en éste caso son 20 minutos de calentamiento del baño y luego 45 minutos de ebullición.

Tabla 2.25

Condiciones del concentrado

Densidad (g/mL)	1.004
Proporción de sólidos (% en peso)	1.77
Proporción de Etanol (% en volumen)	8.8
Proporción de Etanol (% en peso)	6.9
Volumen (mL)	108.8
Contenido de T Acys (mg)	77.8
ID	1.02

Tabla 2.26

Condiciones del destilado

Densidad (g/mL)	0.8488
Proporción de Etanol (% en volumen)	83.9
Proporción de Etanol (% en peso)	78
Volumen recuperado (mL)	194.6

Rendimiento:

% T Acys recuperadas = 65.6%

% en peso de Et-OH recuperado en el destilado = 86.6%

% en peso de Et-OH perdido durante el proceso = 8.4%

Discusión de resultados.

Lo interesante de éstos resultados es la invariabilidad del ID antes y después de concentrar, 1.01 y 1.02 respectivamente, aunque se muestre un aparente aumento de una centésima, éste puede considerarse de poca relevancia, ya que si aproximamos a décimos los dos valores serían 1.0 que indicaría que las cantidades de Acys calculadas por el método de pH Simple y por el método de pH diferencial deben ser casi idénticos.

Ahora, ésta resistencia a altas temperaturas, indicaría dos cosas: se puede destilar el extracto a presión atmosférica (sin vacío), para cáscaras frescas y empezar el estudio de secado por atomización, probando primero sin maltodextrina, puesto que éstos resultados revelan que es bien probable que resista las altas temperaturas a las que se llega en éste tipo de proceso de secado.

2.5 SECADO**2.5.1 Secado por aspersion (Spray Dryer).****Procedimiento**

El secado por atomización es muy usado para la industria alimentaria, para el estudio la necesidad de probar con éste método de secado consta de las razones siguientes:

- La rapidez con que se realiza el proceso en si, puesto que es necesario contar con el mínimo de tiempo posible en secado de productos agroindustriales, por la degradación de los metabolitos constituyentes, entre

ellos los más importantes para el presente estudio, las antocianinas.

- La cantidad de colorante en polvo lo suficientemente provechosa para los ensayos de caracterización.
- Conocer la viabilidad de éste tipo de proceso de secado con las antocianinas, ya que no son todos los productos que se pueden secar bajo éste proceso, por muchas razones como estar expuestas a altas temperaturas, que aunque es por un tiempo relativamente prudente que varía de una a cuatro horas aproximadamente, algunos metabolitos se degradan fácilmente.

Existen encapsulantes (Ej. La maltodextrina) que ayudan a obtener un producto seco en buenas condiciones, ya que protegen al producto contra las altas temperaturas expuestas durante el secado, y para las antocianinas de la mishquipanga ofrece la ventaja, obtener polvo de varios ensayos de extracción en cuestión de horas. Este equipo pequeño de secado por Spray Dryer a escala piloto, tiene un bajo rendimiento, pero con él se obtiene el polvo colorante requerido para el ensayo de caracterización y es posible realizar una simple evaluación a varias temperaturas de secado que fueron 110°C, 120 °C y 150 °C, y aunque, los encapsulantes usados frecuentemente son de bajo costo, no es necesario usarlos para el secado de las antocianinas de la mishquipanga. El equipo de secado, como se muestra en la figura 2.16, consta de lo siguiente:

- Una pera de decantación que sirve para dosificar la solución a secar.
- El dosificador se conecta a un atomizador, que gira por acción de aire a presión, proveniente de un compresor de aire, y que dispersa el producto en pequeñas gotas.

- Y así se ingresa a una cámara amplia donde entran en contacto directo las pequeñas gotas y el aire a altas temperaturas y en cuyo fondo se recogen los sólidos que por acción del flujo de aire pasan a un pequeño ciclón que conduce el producto seco a un frasco de vidrio.

Resultados.

El volumen que se somete a secado, se obtiene de varios ensayos de extracción y concentración y así también se realizan múltiples corridas en el equipo de secado por atomización, con volúmenes diferentes, pero en las tablas 2.27 y 2.28 se muestran las características de una prueba de secado con sus respectivos parámetros controlados.

Tabla 2.27.

Características medidas del concentrado.

Volumen (mL)	300
Proporción de sólidos (% en peso)	2.16
Viscosidad (cp)	1.69
Densidad (g/mL)	1.02

Tabla 2.28.

Características del proceso de secado

Presión de aire de entrada (Kg f/cm²)	4
Temperatura de entrada de aire (°C)	120
Temperatura de salida de aire (°C)	75
Flujo de alimentación del concentrado (mL/min)	7.45

Peso de producto seco recuperado =2.7091 g

Rendimiento = 37.63 %

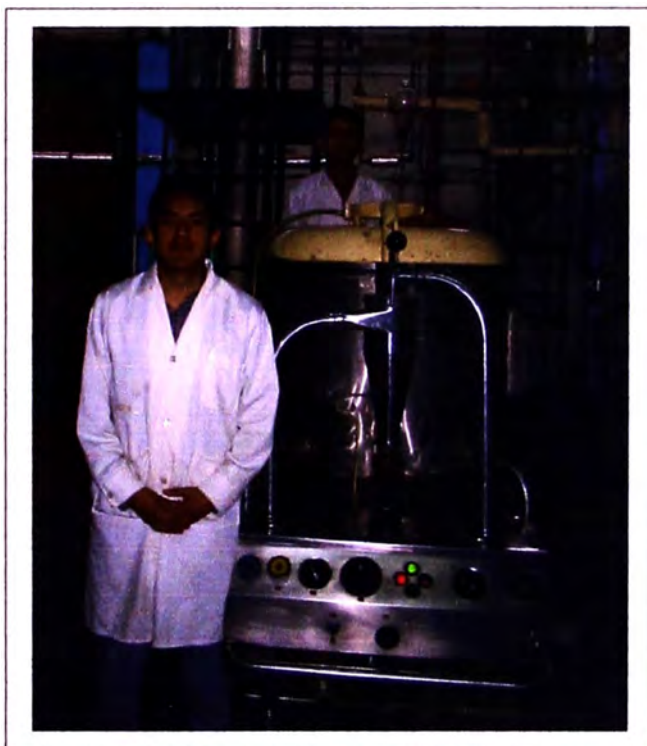


Fig. 2.16. Equipo de secado por aspersión.

También se realiza una prueba de la degradación de antocianinas después del secado; ésta prueba determina como el proceso de secado por aspersión afecta en la degradación de las antocianinas, para realizar dicha prueba se disuelve unos miligramos del polvo colorante (que fue secado a una determinada temperatura) con la solución extractora, luego se procede a medir el índice de degradación. (Tabla 2.29).

Tabla 2.29.
ID del colorante secado por
atomización.

Temperatura de secado (°C)	ID
110	0.97
120	1.01
150	1.02

Discusión de resultados.

Desde el momento en que se observa que se disuelven, toda la cantidad de colorante, ya se puede concluir un éxito en el proceso de secado, desde el punto de vista de resistencia contra la degradación del producto al proceso.

De la tabla 2.29., se puede observar que el índice de degradación toma valores de alrededor de 1, lo cual indica la resistencia de las antocianinas a temperaturas de secado de hasta 150 °C. Aun así ésta temperatura es muy alta e innecesaria para secarlas por atomización ya que su rendimiento en éste tipo de secado no depende de cuan grande sea la temperatura, entonces se recomendaría una temperatura de 120 °C.

Cabe resaltar que el proceso de secado por aspersion se logró sin la adición de encapsulantes, que es un factor considerado importante cuando se trata del tema de costos.

2.5.2 Secado por estufa.

Procedimiento.

Al margen de las ventajas que ofrece un secado por spray dryer, el bajo rendimiento que ofrece en la obtención del colorante seco es razón para buscar otras alternativas para el secado del colorante en laboratorio, una de ellas aquella ayudada por una estufa dosificando pequeñas cantidades de la solución en placas de vidrio para someterlas a temperaturas moderadas de alrededor de 40 °C, la mayor área expuesta al calor permite relativamente, un menor tiempo para secar cada muestra, usando entre 15 a 20 placas. Se secan por grupo de 5 a 6, luego se toma cada placa y se separa el producto seco en un recipiente adecuado, hasta terminar la solución, que es un volumen de la solución concentrada tomada para la prueba de secado anterior.

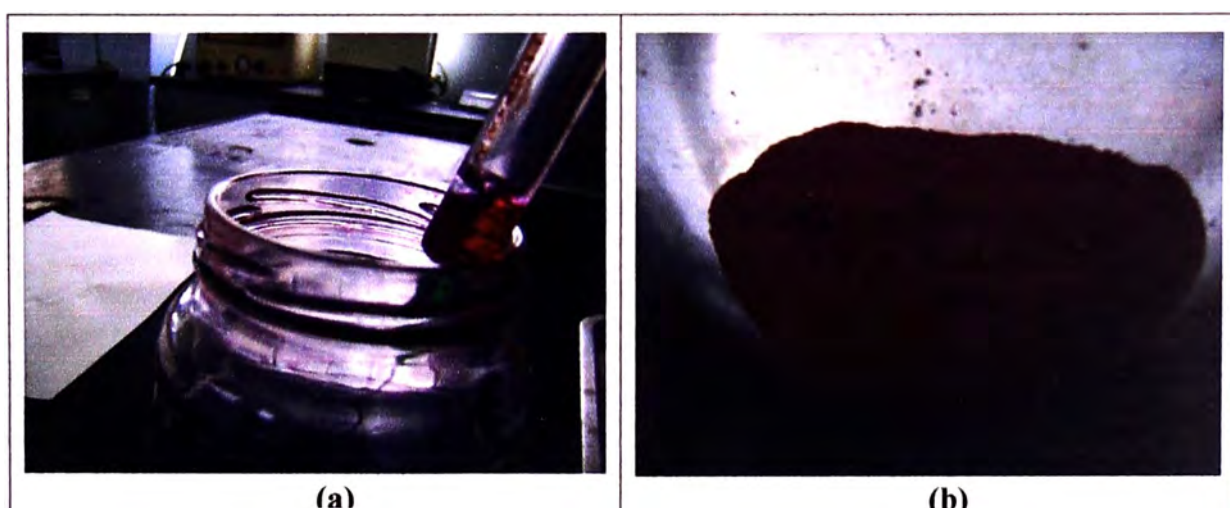


Fig. 2.17. (a) Dosificación mediante una jeringa de la solución concentrada a las placas de vidrio. **(b)** el colorante en polvo recuperado del secado por estufa

Resultados.**Tabla 2.30.** Características medidas del concentrado.

Volumen (mL)	300
Proporción de sólidos (% en peso)	2.16
Viscosidad (cp)	1.69
Densidad (g/mL)	1.02

Peso de producto seco recuperado = 5.8825 g

Rendimiento = 89.15 %

Discusión de resultados

Este procedimiento tiene la ventaja de ofrecer un mayor rendimiento respecto del primero, pero a su vez es más laborioso y exige un mayor tiempo de realización, ya que cada muestra en la placa debe transferirse minuciosa y pacientemente al recipiente colector. Pero a su vez se muestra la pertinencia de mostrar otro método alternativo de secado por aspersion, para poderse evaluar en un estudio a nivel planta piloto, en un secador diseñado con características similares al secado por estufa.

2.6 CARACTERIZACIÓN

2.6.1 Naturaleza química del colorante.

Procedimiento.

Para conocer que tipo de compuesto químico es el principal que le da las propiedades tintóreas que se perciben en éste fruto, se realiza un análisis espectrofotométrico UV-Visible, como primer instrumento que descartará muchas posibilidades.

Según Olga Lock ³⁰ (1997), los flavonoides que absorben fuertemente radiación electromagnética en el rango de 465-560 nm de longitud de onda son las antocianinas y las antocianidinas, siendo éste dato, importante para distinguirlo de los otros flavonoides y otros pigmentos como los carotenoides, cuya forma de su espectro es característica de los mismos, un pico alrededor de 450 nm, y usualmente dos picos de menor intensidad, uno a cada lado; así como de las quinonas, cuyo espectro se diferencia de los anteriores por presentar, usualmente un Pico muy débil en la región visible del espectro. Ahora, una de las que muestran similitud en la forma del espectro suelen ser las betalaínas, teniendo una absorción intensa entre 534-552 nm. De las cuales se debe referir a las betacianinas, ya que el pigmento principal que tiene la mishquipanga muestra un color rojo intenso y de todas las betalaínas las betaxantinas son amarillas y las betacianinas son rojas. Por esa razón, existen ensayos simples de coloración para diferenciar antocianinas y betacianinas, las que se emplean en la presente investigación.

2.6.1.1 Prueba espectrofotométrica UV-Visible.

Se hace una extracción con una relación solvente/cáscara de 50, después de un lapso de tiempo de alrededor de 3 horas aproximadamente se extrae una alícuota de SV = 500 μ l y se diluye en una fiola a 5.00 mL con Buffer de pH = 1.0. Luego se plotea la gráfica de absorbancia vs. Longitud de onda (λ) en el Software del espectrofotómetro UV-Visible, en un rango de 300 nm a 600 nm, ya que entre 200 nm a 300 nm se muestra el efecto del ruido sobre la señal en el espectro y valores de absorbancia muy altos, que son comunes en extractos de antocianinas y no son de ayuda para el propósito.

2.6.1.2 Prueba de coloración para diferenciar Antocianinas de Betacianinas.

Sólo se realizan unas pruebas de las que se muestran en la tabla 1.15.

- Se diluye unos miligramos de polvo colorante con una solución de HCl acuoso 1N, en un tubo de ensayo, luego se agrega KOH al 10%, hasta que la solución se tiña de azul pasando lentamente a verde y después de unas horas a amarillo.
- Después de tomarse de azul la solución, unos minutos después se añade la solución acuosa de HCl y se regenera el color rojo.
- Se diluye unos gramos de polvo de pigmento, en un tubo de ensayo, con la solución anterior de HCl acuosa y se agrega alcohol amílico, formándose dos fases y tornándose la fase amílica de rojo.

Resultados.

2.6.1.3 Prueba espectrofotométrica UV-Visible.

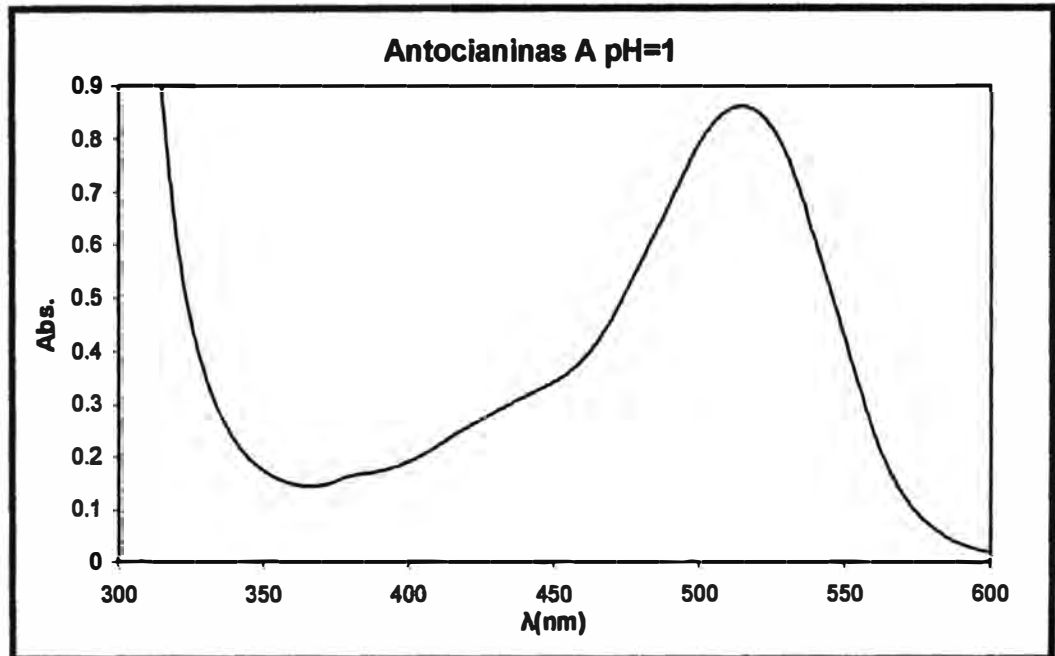


Fig. 2.17. Espectro en la región UV-Visible de las Antocianinas de la mishquipanga.

2.6.1.4 Prueba de coloración para diferenciar Antocianinas de Betacianinas.

En la fig. 2.18. se muestran: a) la disolución de unos miligramos del polvo colorante, con la solución de HCl acuosa 1N, obsérvese el color rojo característico de antocianinas en medio ácido y luego como se recupera este color después de haber titulado con KOH, esta recuperación del color se observará en la figura 2.19. y b) la adición de la solución acuosa de KOH al 10 %, y aquí se observa la tonalidad azul que se quiere formar, mas no se llega a ese color de solución sino hasta que se encuentra la solución en el punto equivalente.

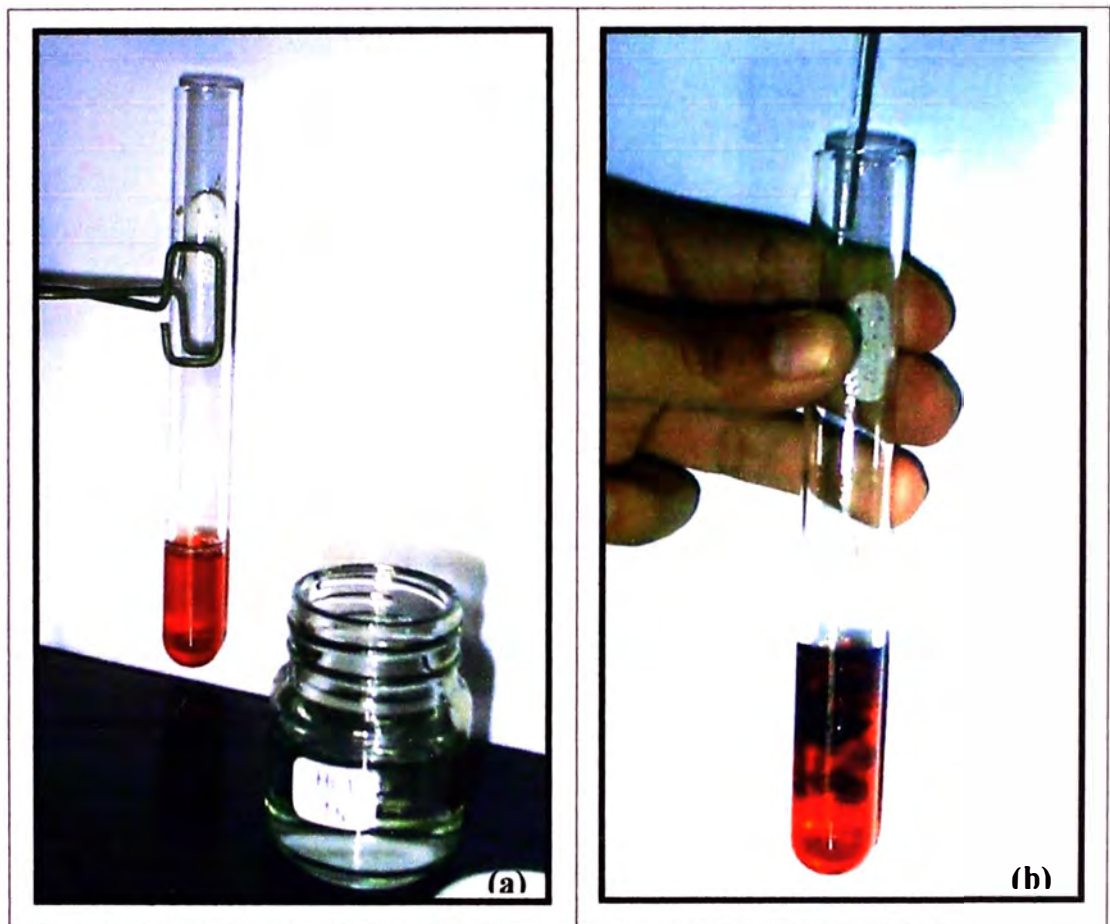


Fig. 2.18. (a): Colorante en polvo, diluido en HCl acuoso. **(b):** Adición de KOH diluido por gotas.

Luego en la fig. 2.19. se muestra el cambio del color de la solución a azul en el punto equivalente y como con el pasar de las horas se torna amarilla. Pero si en sólo minutos de haber llegado al punto equivalente, se adiciona unas gotas de la solución de HCl acuosa la solución regresa a su color inicial rojo.

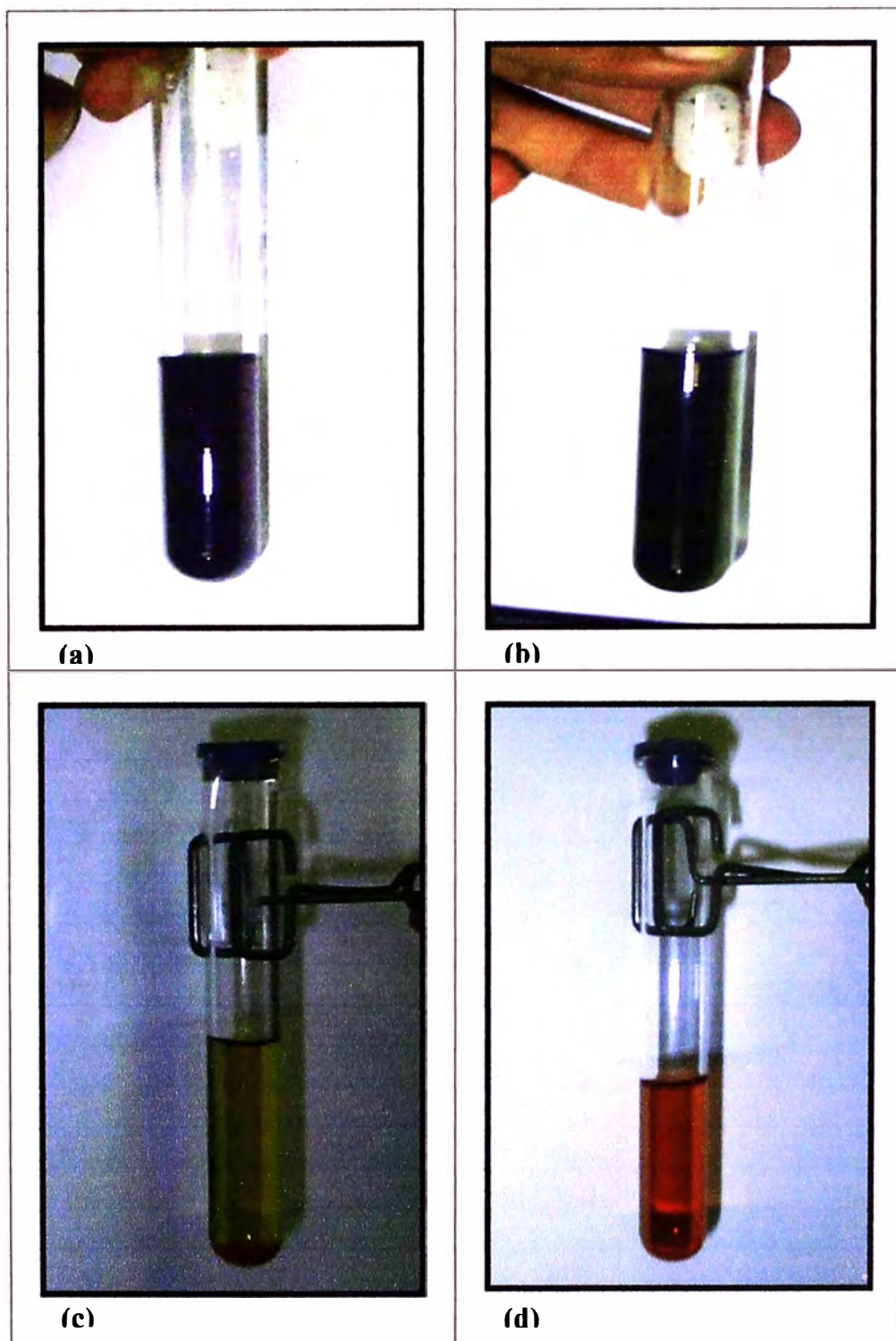


Fig. 2.19. (a): muestra de color azul al llegar al punto equivalente. **(b):** unos minutos después la solución torna verde. **(c):** Y después de unas horas se torna amarilla permanente. **(d):** La misma prueba se repite pero al llegar al punto equivalente (azul) se espera unos minutos y se reacidifica con HCl.



Fig. 2.20. Fase amílica (superior) ligeramente ácida y fase acuosa (inferior) acidificada con HCl.

En la prueba Espectrofotométrica la absorción fuerte en la región visible ($\lambda_{\text{máx}} = 514 \text{ nm}$, Fig. 2.20.) y la forma singular del espectro mismo indica que se puede tratar de una mezcla de antocianinas o en su defecto de betacianinas, ahora, se complementa éste análisis con los ensayos de color, para descartar una de éstas dos posibilidades (ver figuras 2.18., 2.19. y 2.20.), siendo todos aprobatorios a favor de las antocianinas, por lo que se concluye que los

compuestos químicos principales que le dan el color rojo a la cáscara del fruto de la Mishquipanga son **Antocianinas**.

2.6.2 Identificación del esqueleto-antocianidina.

Procedimiento.

2.6.2.1 Hidrólisis de las antocianinas de la mishquipanga.

El polvo seco de antocianinas proveniente del secado por atomización, sin señales de degradación, se somete a hidrólisis para separar los restos azúcares de las antocianinas y así convertirlas en sus respectivas antocianidinas, para ello, según Lock³⁰, se toma 1 mg del pigmento se coloca en un tubo de ensayo, se disuelve en 2.00 mL de Metanol, se agrega 2.00 mL de HCl 2N y se somete a un baño de ebullición por 30 minutos. Después de enfriar la aglicona se extrae con 1.00 mL de alcohol isoamílico (Fig. 2.21.) se retira la fase superior, se lava con agua, cuantas veces sea necesario, para evitar algún azúcar en el extracto amílico que pueda interferir con la purificación y el posterior ensayo espectrofotométrico, luego el extracto orgánico se lleva a sequedad en una placa de toques (Figuras 2.22. y 2.23.) para después redissolver con metanol y correr las cromatografías.

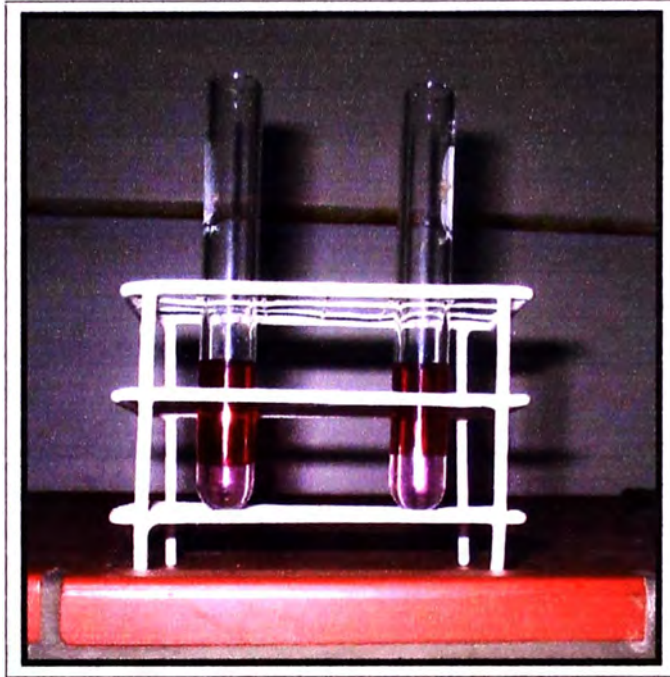


Fig. 2.21. Fases acuosa y amílca después de hidrolizar en los tubos de ensayo.

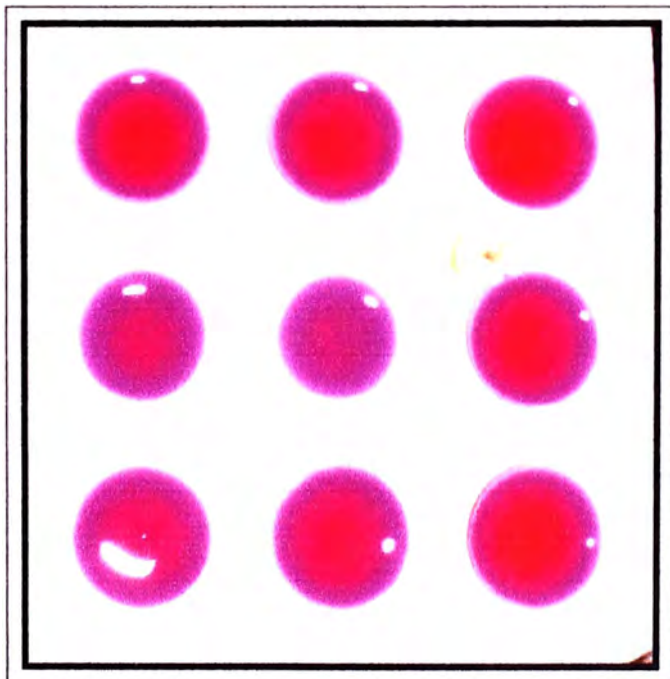


Fig. 2.22. Antocianidinas en alcohol amílico y puesto en una placa de toques para llevar a secado.

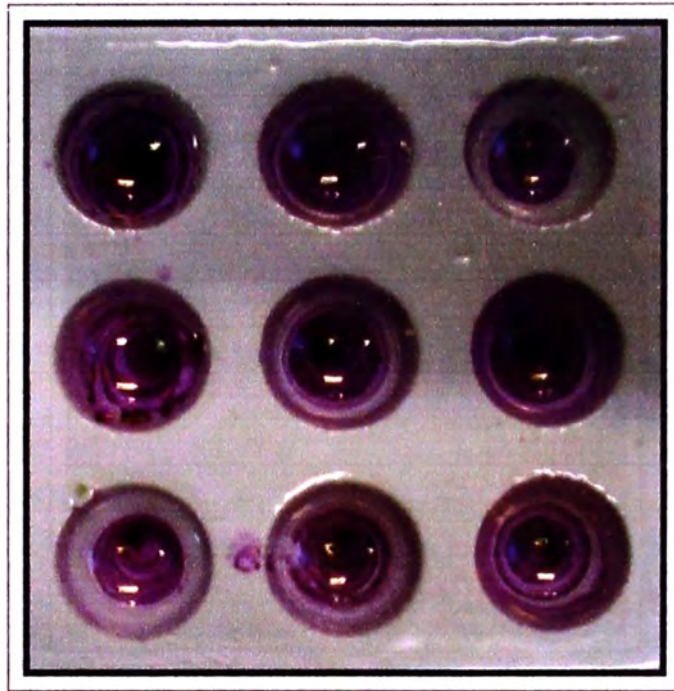


Fig. 2.23. Antocianidinas secas en la placa de toques

2.6.2.2 Purificación por cromatografía en papel bidimensional.

Se logra aislar los componentes del producto seco por cromatografía en una sola dirección como se puede ver en la Fig. 2.24., pero junto con antocianidinas, existen impurezas que se desplazan también con el solvente; a lo largo del cromatograma se puede observar la mancha que deja un rastro gris tenue y en el extremo superior marrón parduzco, lo que lleva a usar dos dimensiones en la purificación por cromatografía tomándose para ello un papel filtro (la especificación del papel no es necesaria, ya que para aislarlos basta con cualquier papel filtro, si se desea reproducibilidad para hallar los R_f de cada antocianidina, se corren cromatografías en papel Whatman N°1 con los pigmentos aislados) de 13 por 13 cm.

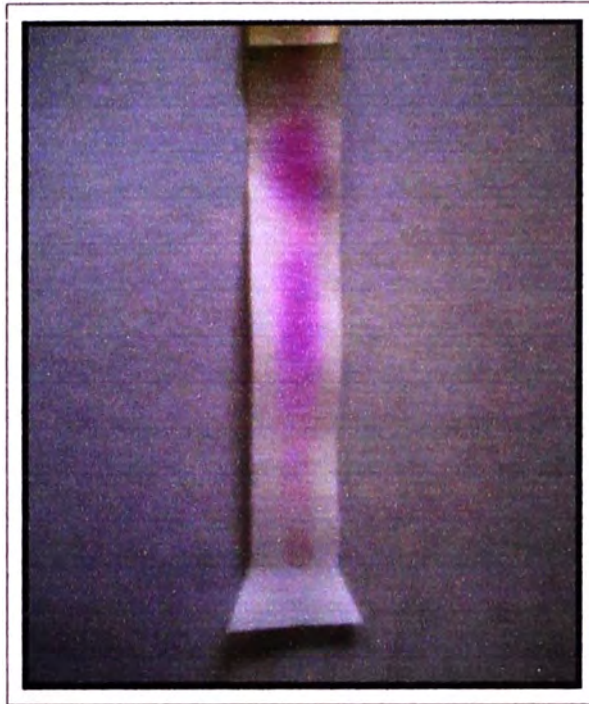


Fig. 2.24. Resultado de un aislamiento de las antocianidinas por cromatografía en una dimensión.

2.6.2.3 Selección de la fase móvil.

Según literaturas revisadas la elección del solvente es crucial para una buena separación. Dicho solvente o secuencia de solventes que pasa a través de la fase estacionaria (papel en este caso) debe ser capaz de mover lo más separadamente posible los pigmentos sobre ella. Ya existen distintos sistemas que fueron probados para antocianinas: BAW (n-butanol:ácido acético glacial:agua, 4:1:5, fase superior); Bu:HCl (n-butanol:HCl 2N, 1:1, fase superior); Fórmico (Ácido fórmico:HCl conc:agua, 5:5:3), Forestal (Ácido acético glacial:HCl conc:agua, 30:3:10), entre otros. Después de muchas pruebas se encuentra la secuencia que separa mejor los pigmentos, para el caso de las antocianidinas de la mishquipanga, ofrecen separaciones

satisfactorias una primera corrida con Fórmico (primera dimensión) y posteriormente con BAW (segunda dimensión).

2.6.2.4. Identificación de las antocianidinas individuales por medio de sus espectros UV-Visible.

Se repite el procedimiento cromatográfico muchas veces, para obtener suficientes cromatogramas, que al eluirlos resulte en una solución concentrada que otorgue un espectro de cada una lo más clara posible. Seguidamente, se extraen las bandas de colores del papel y se eluyen con metanol puro grado reactivo para correr el espectro UV de cada una para una longitud de onda de 200 nm a 600 nm para poder comparar con los espectros standard de las antocianidinas mostradas en la sección 1.2.2.9.C., además de su longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{m\acute{a}x.}$), en metanol con 0.01% HCl y de la relación de la absorción a 440 nm y a la $\lambda_{m\acute{a}x.}$, que son características de cada una de las antocianidinas reportadas.

2.6.2.5. Identificación final de las antocianidinas individuales por medio del Rf.

Cada solución metanólica con los respectivos compuestos aislados se secan en una placa de toques y se preparan para correr varias cromatografías con el fin de medir el valor de Rf de cada uno y compararlo con los reportados por las diferentes literaturas para las antocianidinas puras (Ver tablas 1.17. y 1.18.), lo que se realiza en papel Whatman N°1.

Resultados.

2.6.2.6. Purificación por cromatografía en papel bidimensional.

El cromatograma muestra la presencia de tres pigmentos de colores púrpura, magenta y naranja, éste último se muestra en la primera corrida de una dimensión (con fórmico), siendo una banda larga (Fig. 2.24.) que luego desaparece de la visión humana al correr la otra dimensión con BAW, mas las otras bandas prevalecen con su color, nombrándolas posteriormente Banda 1 (banda púrpura) y Banda 2 (banda magenta), y se ubican como se muestra en la Fig. 2.25.

Se repite cerca de diez veces el mismo procedimiento, y se corta las zonas con los pigmentos observados para el análisis espectrofotométrico.

Fig. 2.25. Esquema De La Primera Fase Con Fórmico.

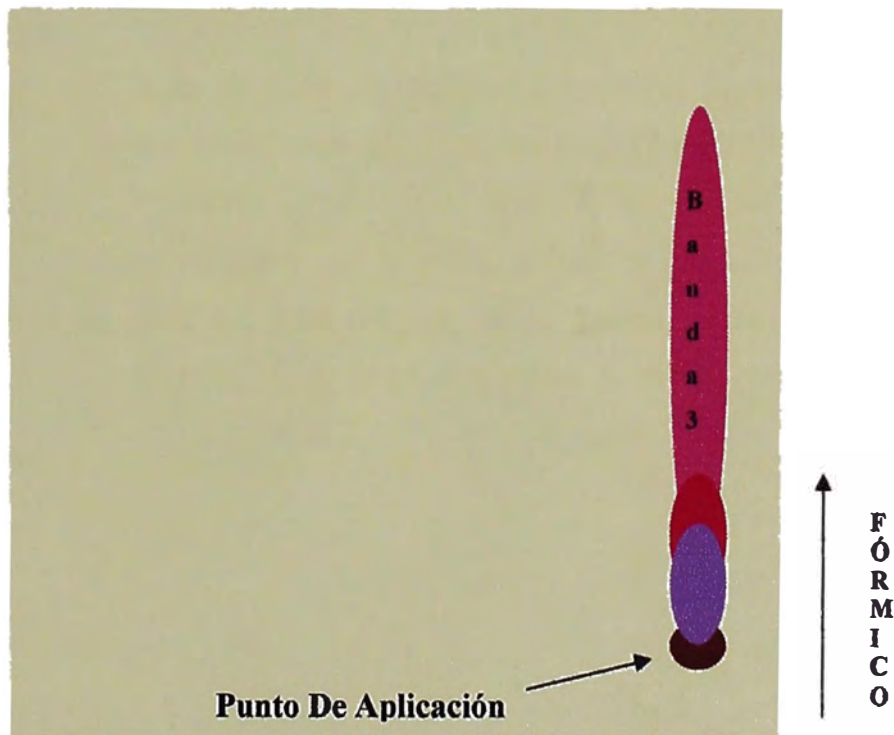
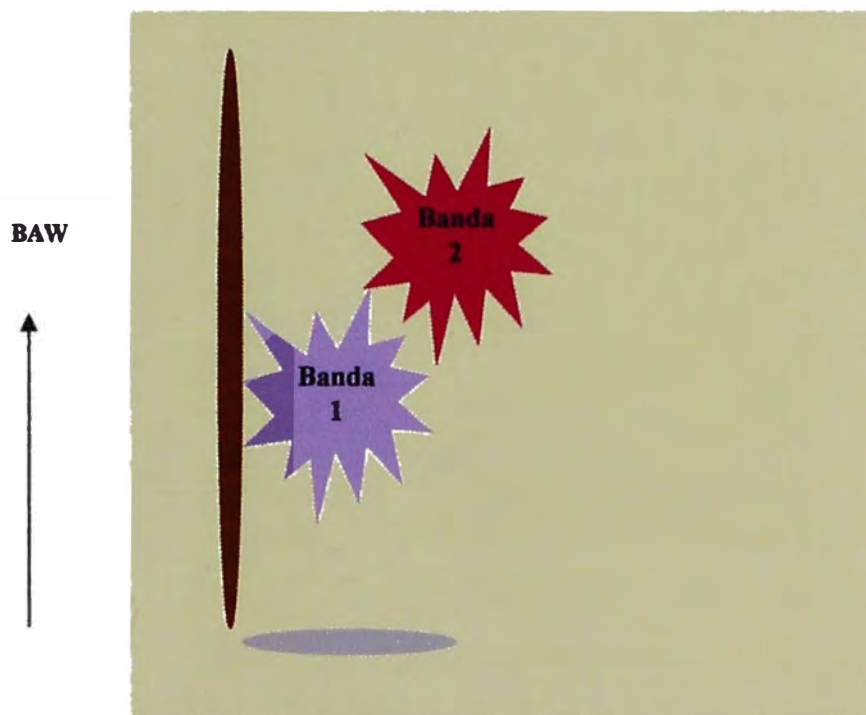


Fig. 2.26. Esquema De La Segunda Fase Del Cromatograma Bidimensional (Girando el papel 90° v usando BAW)



En la Fig. 2.27. se muestra el punto de aplicación que, como se observa, se procura que sea lo más concentrado posible, para así tener la suficiente cantidad de bandas puras para los posteriores ensayos de identificación, luego la Fig. 2.28 muestra unas fotos con la secuencia de la primera purificación con Fórmico, en las muestras b) y c) se observa que va apareciendo una banda semi-rosada de baja intensidad, la misma que en d) se muestra junto con las otras dos bandas juntas en la parte inferior.

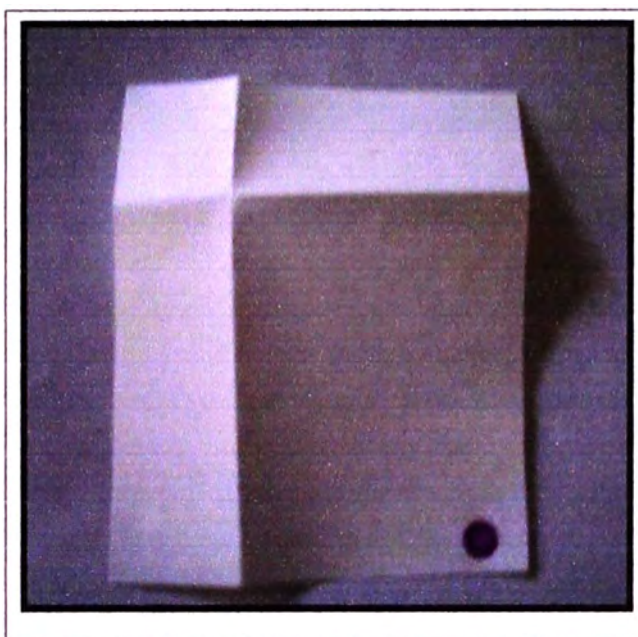


Fig. 2.27. Dimensiones y punto de aplicación en el cromatograma.

Según la Fig. 2.29. que muestra el cromatograma final de la purificación de nuestras antocianidinas, los colores observados son: para la banda 1, púrpura, para la banda 2, rojo; ahora, son ciertas antocianidinas, que muestran estos colores en patrones Standard, como son para el púrpura para la Delfinidina, Malvidina y Petunidina y los rojos Pelargonidina, Cianidina y Peonidina, como se puede observar en la tabla 1.18.; evidentemente ésta observación falta ser complementada, por lo que se miden otras propiedades de éstos compuestos ya purificados.

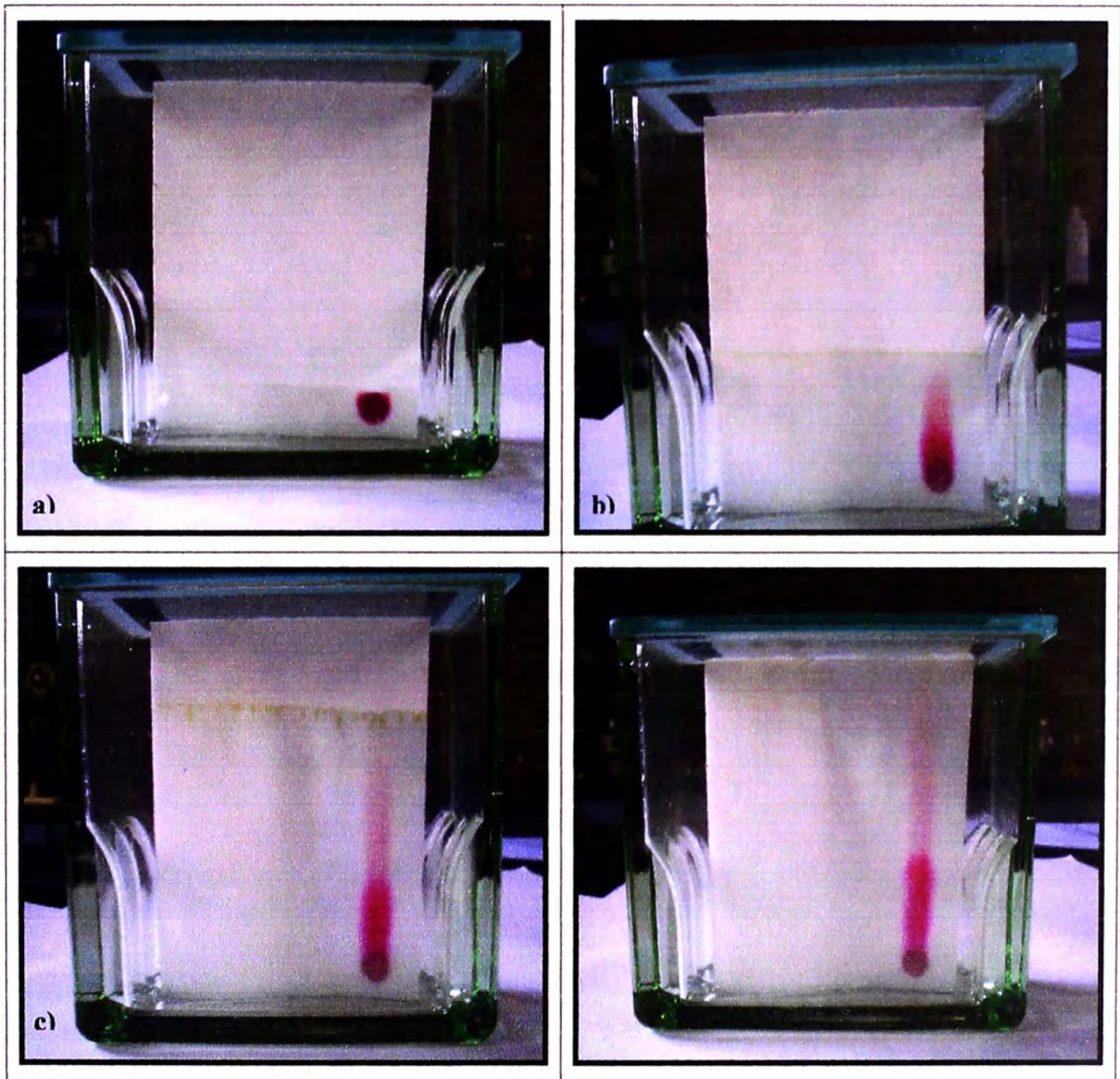


Fig. 2.28. Secuencia de la primera fase con Fórmico.



Fig. 2.29. Cromatograma final, después de las dos purificaciones.

2.6.2.7 Identificación de las antocianidinas individuales por medio de sus espectros UV-Visible.

Cada elusión metanólica de antocianidinas por separado se lleva a un análisis espectrofotométrico UV - Visible, donde se plotean los espectros de absorción de la banda 1 y 2.



Fig. 2.30. Eluentes de la banda 1 y 2, después de cortar las bandas del papel y sumergirlos en Metanol puro.

BANDA 1

$$\lambda_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}} = 548 \text{ nm}$$

$$\text{ABS } \lambda_{440} / \text{ABS } \lambda_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}} = 0.17$$

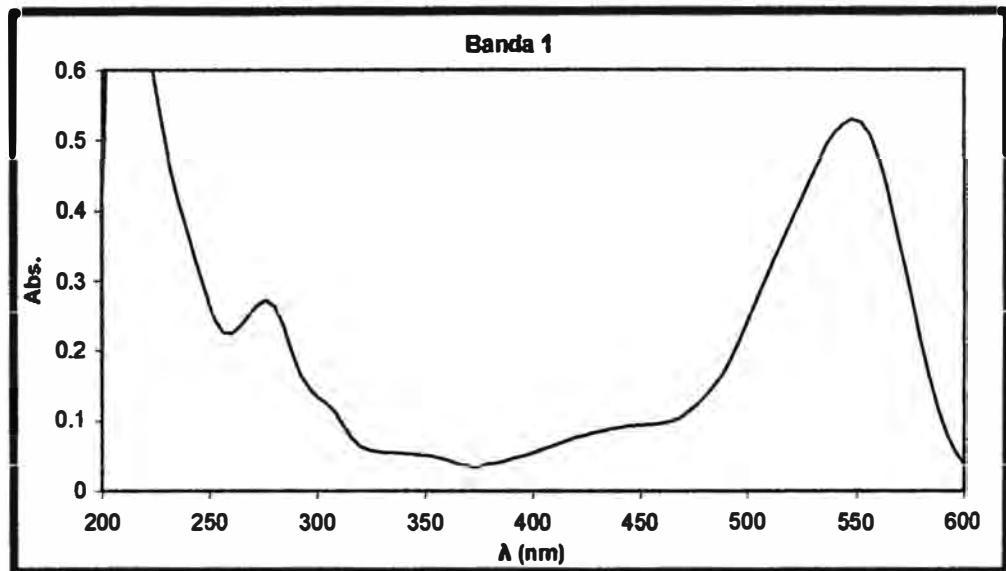


Fig. 2.31. Espectro de absorción UV-Visible de la banda 1.

BANDA 2

$$\lambda_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}} = 539 \text{ nm}$$

$$\text{ABS } \lambda_{440} / \text{ABS } \lambda_{\text{m}\acute{\text{a}}\text{x}} = 0.22$$

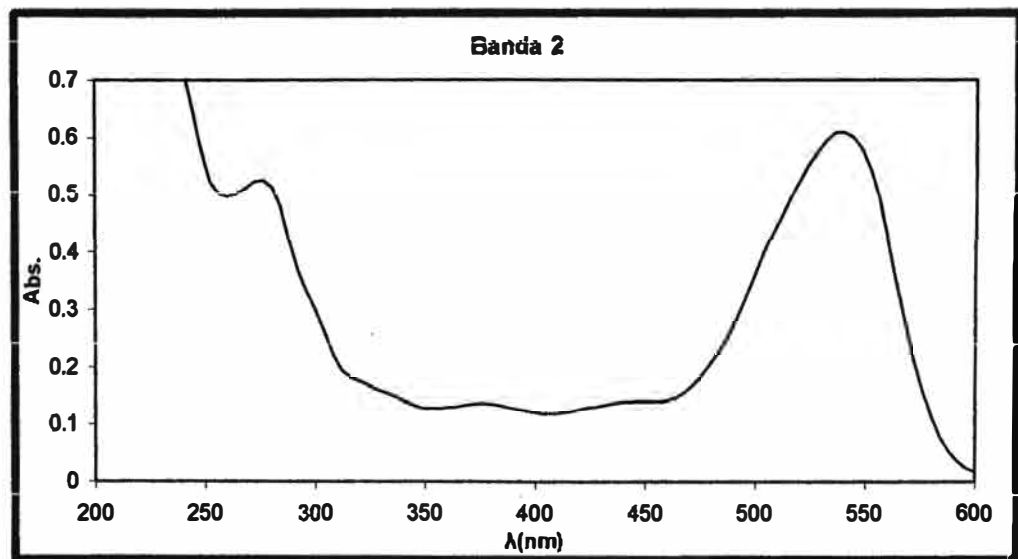


Fig. 2.32. Espectro de absorción UV-Visible de la banda 2.

La Banda 3 aunque desaparece en la segunda corrida cromatográfica con BAW, se logra separarla al realizar cromatogramas sólo con fórmico, y luego eluirla con el mismo metanol, siendo la muestra como se muestra en la Fig. 2.34.



Fig. 2.33. Elución en Metanol de la banda 3.

Luego de analizar su espectro fue el siguiente:

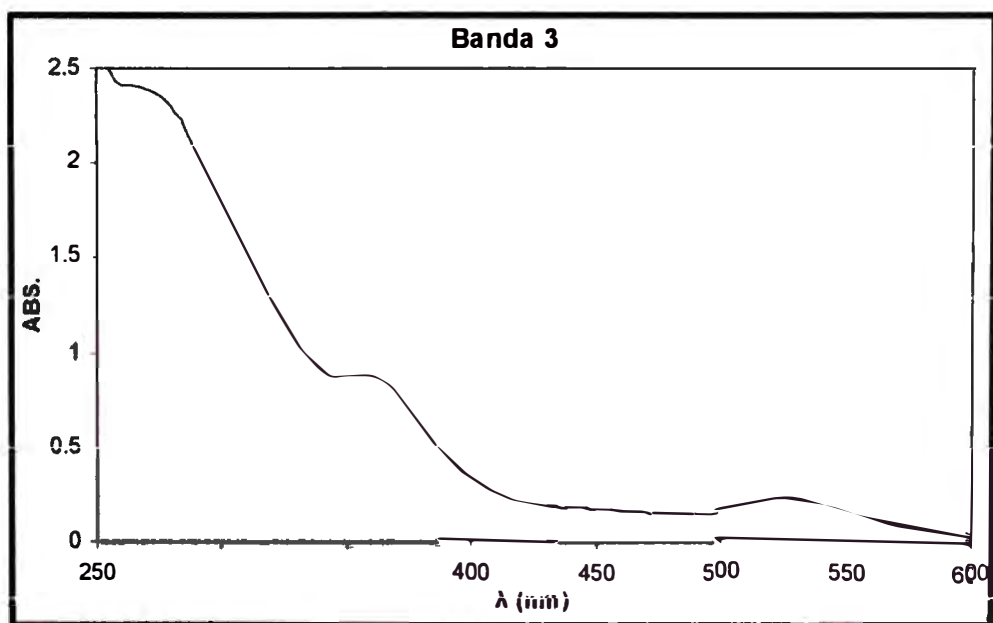


Fig. 2.34. Espectro de absorción UV-Visible de la banda 3.

Discusión de resultados.

Antes de analizar los parámetros que muestran los espectros hay que recordar que las gráficas patrones fueron medidas en Etanol-0.01% HCl y los valores de $\lambda_{m\acute{a}x}$ en Metanol-0.01% HCl, y en el presente caso se usa Metanol puro grado reactivo sin HCl. Pero la muy pequeña cantidad de HCl, sólo aseguraría la presencia del cromóforo y como en las cromatografías para el aislamiento se usaron solventes ácidos, el cromóforo se mantuvo como tal hasta en la elución metanólica, lo cual es evidente por los colores que se muestran en la Fig. 2.30. Ahora, comparando con los valores de las tablas 1.11. y 1.12., los $\lambda_{m\acute{a}x}$ y de ABS $\lambda_{440}/ABS \lambda_{m\acute{a}x}$ que se acercan bastante a los resultados obtenidos fueron:

Tabla 2.30.

Comparación de las propiedades espectrales de la banda 1 con la de las antocianidinas y las alternativas posibles.

PROPIEDADES	Banda 1	ALTERNATIVAS	
		Delfinidina	Petunidina
$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	548	546	543
ABS $\lambda_{440}/ABS \lambda_{m\acute{a}x}$	0.17	0.16	0.17

Tabla 2.31.

Comparación de las propiedades espectrales de la banda 2 con la de las antocianidinas y las alternativas posibles.

PROPIEDADES	Banda 2	ALTERNATIVAS	
		Cianidina	Peonidina
$\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	539	535	532
ABS $\lambda_{440}/ABS \lambda_{m\acute{a}x}$	0.22	0.19	0.25

En las posibilidades que tiene la banda 1 las dos relaciones de ABS λ_{440} /ABS $\lambda_{m\acute{a}x}$, son muy semejantes pero la $\lambda_{m\acute{a}x}$ es más semejante a la Delfinidina que a la Petunidina; en el caso de la banda 2, la $\lambda_{m\acute{a}x}$ de la cianidina se acerca más que el de la Peonidina pero la relación ABS λ_{440} /ABS $\lambda_{m\acute{a}x}$, muestra que la dicha banda puede ser cualquiera de los dos debido a la diferencia por exceso y por defecto. Sin embargo, ésta relación se muestra muy marcadamente en el hombro del espectro de la Peonidina Standard entre 410 y 450 nm (Fig 1.27.), detalle que no se muestra en el espectro de la banda 2.

Se pensó que hubiera sido muy atrevido tomar una decisión sobre la identidad de ambas bandas, aunque lo anterior descartó muchas otras posibilidades se realizó un ensayo más que tal vez pudiera definir por fin éstas hipótesis anteriores.

En lo que respecta a la banda 3, evidentemente su espectro presentado (Fig. 2.34.), y su color (un naranja muy tenue que desaparecía más rápido respecto a las otras bandas, Fig. 2.33.), revela que aparentemente no se trata de ninguna antocianidina, es más, relacionando la forma de su espectro con literaturas es posible, tal vez, que se tratase de una Quinona y no se abarcó más sobre éste analito por lo que éste análisis ya se alejaría del objetivo principal que es el estudio de antocianinas.

2.6.2.8. Identificación final de las antocianidinas individuales por medio del Rf.

Los resultados de las mediciones de los Rf de cada muestra fueron los siguientes:

Tabla 2.32.

Cromatografía de las bandas purificadas, con el objetivo de medir el Rf, en distintos sistemas.

Analito	Rf en	
	AcOH-HCl conc.-H ₂ O (5:1:5)	Forestal
Banda 1	0.23	0.34
Banda 2	0.35	0.48

Comparando con los Rf Standard, los más probables del grupo que se mencionó anteriormente son:

Tabla 2.33.

Comparación de los Rfs calculados para la banda 1 y la comparación con las dos alternativas mostradas en la tabla 2.2.27. en los respectivos sistemas.

Analito	Rf en	
	AcOH-HCl conc.-H ₂ O (5:1:5)	Forestal
Banda 1	0.23	0.34
Deifinidina	0.22	0.32
Petunidina		0.46

Tabla 2.34.

Comparación de los Rfs calculados para la banda 2 y la comparación con las dos alternativas mostradas en la tabla 2.2.28. en los respectivos sistemas.

Analito	Rf en	
	AcOH-HCl conc.- H₂O (5:1:5)	Forestal
Banda 2	0.35	0.48
Cianidina	0.34	0.49
Peonidina	0.50	0.63

Esta prueba es muy importante ya que es aquí donde se ve claramente la identidad más probable que tiene las antocianidinas de la mishquipanga, aunque la Petunidina carecía de valor de Rf en medio AcOH-HCl conc.-H₂O (5:1:5), la diferencia que se observó en el otro medio fue suficiente y más las observaciones anteriores no fue de grado de urgencia la presencia de éste valor para poder expresar las siguientes conclusiones:

- La banda 1 es la delfinidina.
- La banda 2 es la cianidina.

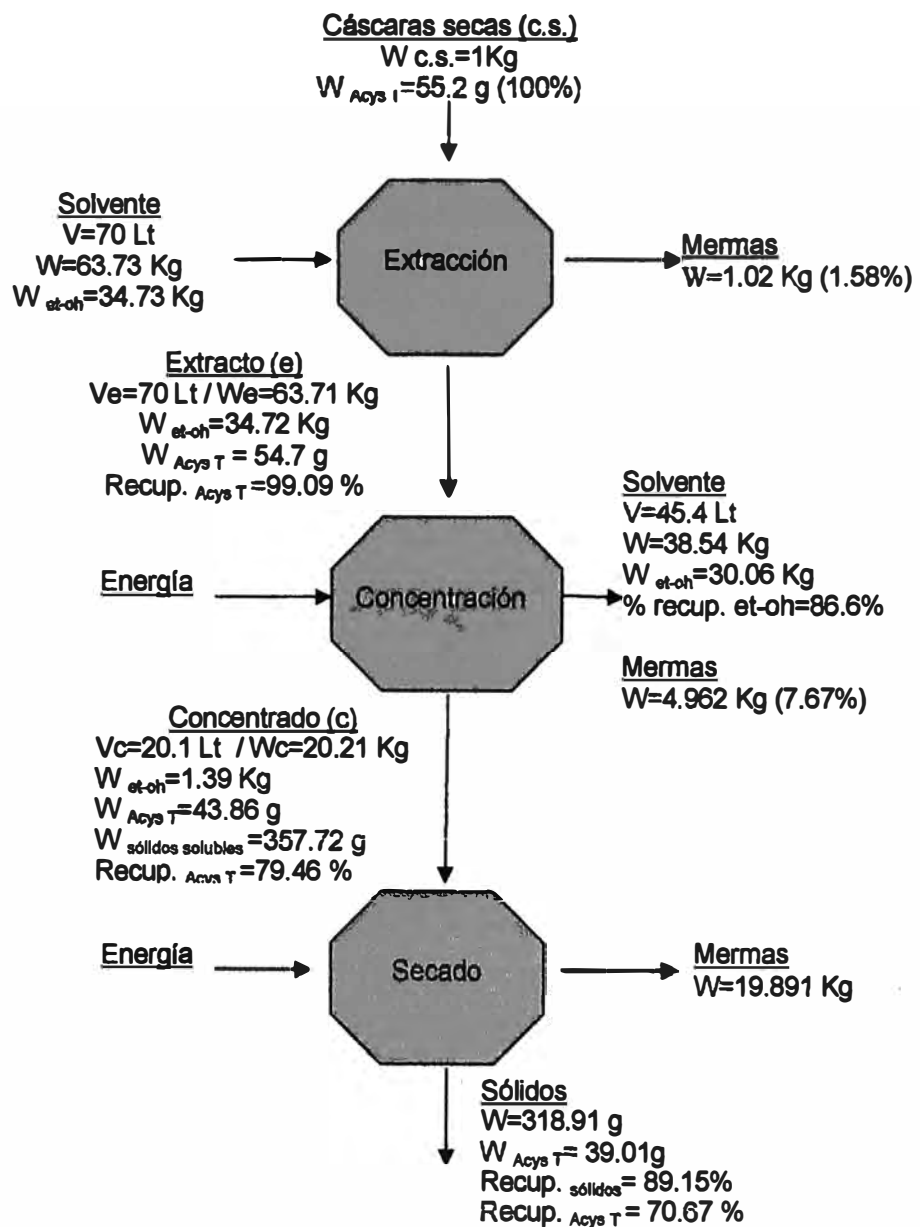
CAPÍTULO III:

BALANCE DE MASA, ENERGÍA Y DE COSTOS

3.1 BALANCE DE MASA.

Con los resultados que se obtienen de los análisis en la extracción, concentración y secado del colorante en estudio se puede sugerir un posible proceso a nivel laboratorio.

DIAGRAMA DE FLUJO DE PROCESO



3.1.1. Condiciones a evaluar.

Tabla 3.1.

Características del proceso de extracción

Temperatura (°C)	50
Proporción de etanol en el solvente (% en volumen)	62.4
Conc. De HCl (N)	0.6
pH Solvente	0.95
Relación Solvente/Cáscara	70
Tiempo de Extracción (min)	120
Peso de cáscaras secas (Kg)	1
C_{Acys} (mg Acys/g c.s.)	54.7

Si se toma como base 1 Kg. de cáscaras secas (c.s.) entonces le corresponderá 70 L, de un solvente extractor preparado con Et-OH 96%-HCl 0.6N (65:35), para dar una solución al 62.4% en volumen de etanol aproximadamente y un pH de aproximadamente 1 en la solución extractora. Y una concentración de T Acys que se toma de la tabla 2.22. con las características de la presente prueba (tiempo de extracción a 120 min. y relación solvente cáscara) y de la tabla 2.24 es de ayuda considerar las propiedades del solvente extractor para el balance de masa del etanol, puesto que se recupera cierta proporción del mismo. También de la tabla 2.22. la extracción se toma a la cantidad de antocianinas extraídas en 160 min. como la cantidad de Acys T, que contiene la cáscara.

Concentración de T Acys: 55.2 mg/g c.s. \Rightarrow para 1000 g c.s. hay 55.2 g de T Acys.

Según la tabla 2.24, la densidad del extracto es 0.9105 g/mL, y con el volumen de 70L, se calcula el peso de extracto, luego con la proporción en peso de etanol (55%) se calcula la masa del mismo, pero ésta masa representa al etanol con los metabolitos (sólidos disueltos) extraídos de las cáscaras, por lo que hay que restarle la proporción en peso de sólidos en el extracto (0.92%).

Peso de extracto: 63.73 Kg.

Contenido de Et-OH: 34.73 Kg

En las tablas 3.2 y 3.3 se muestran las propiedades de los procesos de concentración por destilación y del secado, con las mencionados datos medidos, se procede al balance de masa para determinar las proporciones de recuperaciones y las pérdidas, en lo que respecta al total de masa usada (cantidad de solvente y cáscaras secas de mishquipanga), las masas de Etanol (recuperado por destilación) y de las antocianinas totales (T Acys) encontradas en el polvo seco obtenido al final.

Tabla 3.2.

Características del proceso de concentración.

Proporción de Et-OH en el destilado (% en peso)	78
Proporción de Et-OH en el concentrado (% en peso)	6.9
Densidad del destilado (g/mL)	0.8488
Densidad del concentrado (g/mL)	1.004

Tabla 3.3.
Características del proceso de secado.

Temperatura de la estufa (°C)	50
Proporción de sólidos en el concentrado (% en peso)	1.77

3.1.2 Balance.

La tabla 3.4 muestra las cantidades iniciales y las recuperadas en cada sub-proceso a nivel laboratorio, de manera tabulada, lo que se puede comparar con el diagrama de flujo del proceso mostrado al inicio del presente capítulo.

Tabla 3.4.
Cantidades recuperadas.

Etapas	Total		Etanol	T Acys	
	W (Kg)	V (L)	W (Kg)	W (g)	C (Kg/L)
Extracto	63.73	70.0	34.73	54.70	0.781
Destilado	38.54	45.4	30.06	-----	-----
Concentrado	20.21	20.1	1.39	43.76	1.78
Secado	0.318	-----	-----	39.01	-----

El rendimiento mostrado en la tabla 3.5, relaciona a los sólidos solubles que son extraídos de las cáscaras, en los que están incluidas las antocianinas, y su medición antes (concentrado) y después (polvo seco) del proceso de secado lo que muestra la eficiencia de la técnica, por estufa.

Tabla 3.5.
Rendimiento del proceso de secado.

Material	Concentrado W (g)	Secado W (g)	Rendimiento (% en peso)
Sólidos Solubles	357.72	318.91	89.15

En el balance de pérdidas (tabla 3.6) de masa total es sólo la diferencia de masas entre la masa del solvente y cáscaras secas menos la masa de solvente destilado y el colorante en polvo. Luego se comparan la proporción de las masas de etanol y de T Acys perdidas en el proceso, respecto con ésta masa total perdida. Para las T Acys se compara, para la destilación, la cantidad en la 1era etapa de extracción con la masa de T Acys en el concentrado; y para el secado se miden las antocianinas en el producto seco y se resta de las del concentrado.

Tabla 3.6.
Cantidades perdidas.

Material	Pérdidas		
	Absolutas (g)	Proporción (% en peso)	
Totales (mermas totales)	25872	100	
Etanol	3280	12.68	
T Acys	Concentración	18.79	82.38 ⁱ
	Secado	4.02	17.62 ⁱ
	Total	22.81	0.09

Las proporciones en la tabla 3.7 muestran en cada proceso el porcentaje en peso recuperado de Etanol y de T Acys, en el Etanol sólo se recupera en mayor proporción en el

ⁱ Porcentajes respecto a la pérdida total de TAcys (22.81 g)

destilado y en muy poca cantidad en el concentrado, en el caso de las T Acys se muestra desde el concentrado hasta el polvo seco.

Tabla 3.7.
Proporciones de cantidades recuperadas.

Material	Recuperación en el extracto (% en peso)	Recuperación en el concentrado (% en peso)	Recuperación en el destilado (% en peso)	Recuperación en el secado (% en peso)
Etanol	-----	4	86.6	-----
T Acys	99.09	79.46	—	70.67

3.2 BALANCE DE ENERGÍA.

El siguiente balance implica la energía consumida durante los procesos de extracción, concentración y secado, en los tres casos se realizarán los cálculos con las respectivas potencias de cada equipo y con el tiempo de cada sub-proceso.

Tabla 3.8.
Energía en cada etapa y total.

Etapa		Potencia (kW)	Tiempo (h)	Energía (K cal)
Extracción		1.00	2.33	2003.4
Concentración	Rota-vapor	0.12	1.00	103.18
	Calentador	0.50	1.00	429.92
Secado		16.4	0.70	9871.02

3.3 COSTO.

A continuación se muestran los costos en consumo de insumos y energía de los equipos usados en laboratorio, como datos referenciales que pueden mostrar secciones de mayores y menores exigencias en costos.

3.3.1 Costo de materiales.

Tabla 3.9.
Costo de materiales (sin IGV).

Insumos	Consumo (litros)	Precio (soles/litro)	Costo (soles)
Etanol 96%	43.68	3	131.04
Agua Tratada	26.32	2.38	62.64
HCl conc. ⁱ	1.316	2.58	3.40

Costo total en materiales = s/. 197.08.

3.3.2 Costo de energía.

Tarifa Energética = 12.04 soles/kWh.

Para analizar los costos energéticos, se presenta primero los gastos que por su potencia, consumen cada equipo en sus respectivas etapas y luego el tiempo de de operación del mismo. En cada etapa se presenta una potencia individual, excepto en la de concentración, porque están involucrados dos aparatos, el rota-vapor y el calentador de baño maría, como muestra la fig. 2.4. Para el secado el valor dado es referencial, mas aún información obtenida de los mismos operadores.

Tabla 3.10. Costo energético (CE).

Etapa		Potencia (kW)	Tiempo (h)	CE (s./)
Extracción		1.00	2.33	28.08
Concentración	Rota-vapor	0.12	1.00	1.38
	Calentador	0.50	1.00	6.02
Secado		16.4	0.70	138.19

ⁱ Volumen de HCl comercial (37%), necesario para preparar el volumen de solución extractora.

Costo total energético = s/. 173.67.

**∴ Costo total = Costo de materiales + Costo energético =
s/. 370.75 soles.**

Ahora el costo de proceso por la obtención de colorante en polvo a nivel laboratorio es de:

$$\frac{\text{Costo de Proceso Total}}{W \text{ Producto}} = \frac{s/.370.75}{318.91g} = s/.1.16/g. \text{ colorante en polvo}$$

Y el costo por unidad activa, es decir, por unidad de masa de Acys T es:

$$\frac{\text{Costo de Proceso Total}}{W \text{ Acys T}} = \frac{s/.370.75}{39.01g} = s/.9.50/g. \text{ Acys T}$$

CAPÍTULO IV:

PROPUESTA DE PROCESO A NIVEL PLANTA PILOTO

4.1 ALMACÉN DE CÁSCARAS SECAS.

Después de la cosecha se separan las cáscaras de la pulpa manualmente, y luego del secado que puede ser al medio ambiente (en temporada de verano) o en una cámara especial donde la temperatura no sobrepase los 50 °C, que según la experiencia en laboratorio en menos de un día se puede tener la materia prima lista para su almacenamiento, hasta que se procese.

4.2 PREPARACIÓN PREVIA A LA EXTRACCIÓN.

Las cáscaras secas, se transportadas a un molino de barras para su trituración, como parte del proceso de preparación para la extracción, ya que se conoce la dureza del endocarpio leñoso de la cáscara, que al menos para la variedad 1, es un poco más resistente al molido. Cabe recalcar que la ruptura de las paredes celulares favorece la transferencia del colorante y también de otros metabolitos que por lo general se encuentran dentro de la célula de la biomasa. La trituración también va a favorecer la limpieza de las impurezas secas y adheridas a la superficie de las cáscaras en lo que se refiere a la remoción y luego mediante una zaranda se separan de las cáscaras limpias.

4.3 EXTRACCIÓN.

La extracción, objeto del presente estudio a nivel laboratorio, dependerá de los siguientes parámetros, que se controlarán y monitorearán durante éste proceso:

- **Agitación moderada, para la homogenización de la solución.**
- **Mantener el pH de la solución alrededor de 1, que se logra por la mezcla de Et-OH 84° : HCl 0.9N (75:25), que se prepara previo a la extracción.**
- **Temperatura de la extracción de alrededor de 50 °C, ésta temperatura es referencial y la elección de la misma para el proceso es sobretodo por razones económicas, en lo que se refiere a ahorro de energía, de lo contrario podría usarse también una temperatura como de 70 °C, para una extracción más rápida pero cuidando el tiempo de extracción para que no afecte la degradación de las antocianinas.**
- **Tiempo de extracción, puede ser de alrededor de 40 minutos que se recomienda en la evaluación del efecto de solvente/cáscara.**
- **Relación solvente/cáscara, se recomienda mantener dicha relación en 70, puesto que un valor mayor no presenta mucha diferencia de extracción como se mencionó en la evaluación del efecto solvente/cáscara.**

Luego de terminada la extracción, la solución pasa a través de una malla de acero, incorporada en el extractor, que retendrá los sólidos mayores de 1 cm de tamaño, ésta filtración es un sub-proceso previo a la separación de los impurezas sólidas de la parte líquida del extracto, éstas impurezas son residuos de las cáscaras secas que fueron trituradas y sometidas a extracción.

4.4 CENTRIFUGACIÓN Y DECANTACIÓN.

El extracto caliente pasa por un proceso sencillo de enfriamiento que consiste de un intercambiador de calor, por donde se enfría hasta temperatura ambiente, luego se procede a separar los sólidos de la parte líquida de la solución, por lo que es llevado a una centrífuga separadora y decantadora, donde se obtiene un extracto limpio de impurezas y de residuos de cáscaras arrastradas por los procesos anteriores.

4.5 CONCENTRACIÓN.

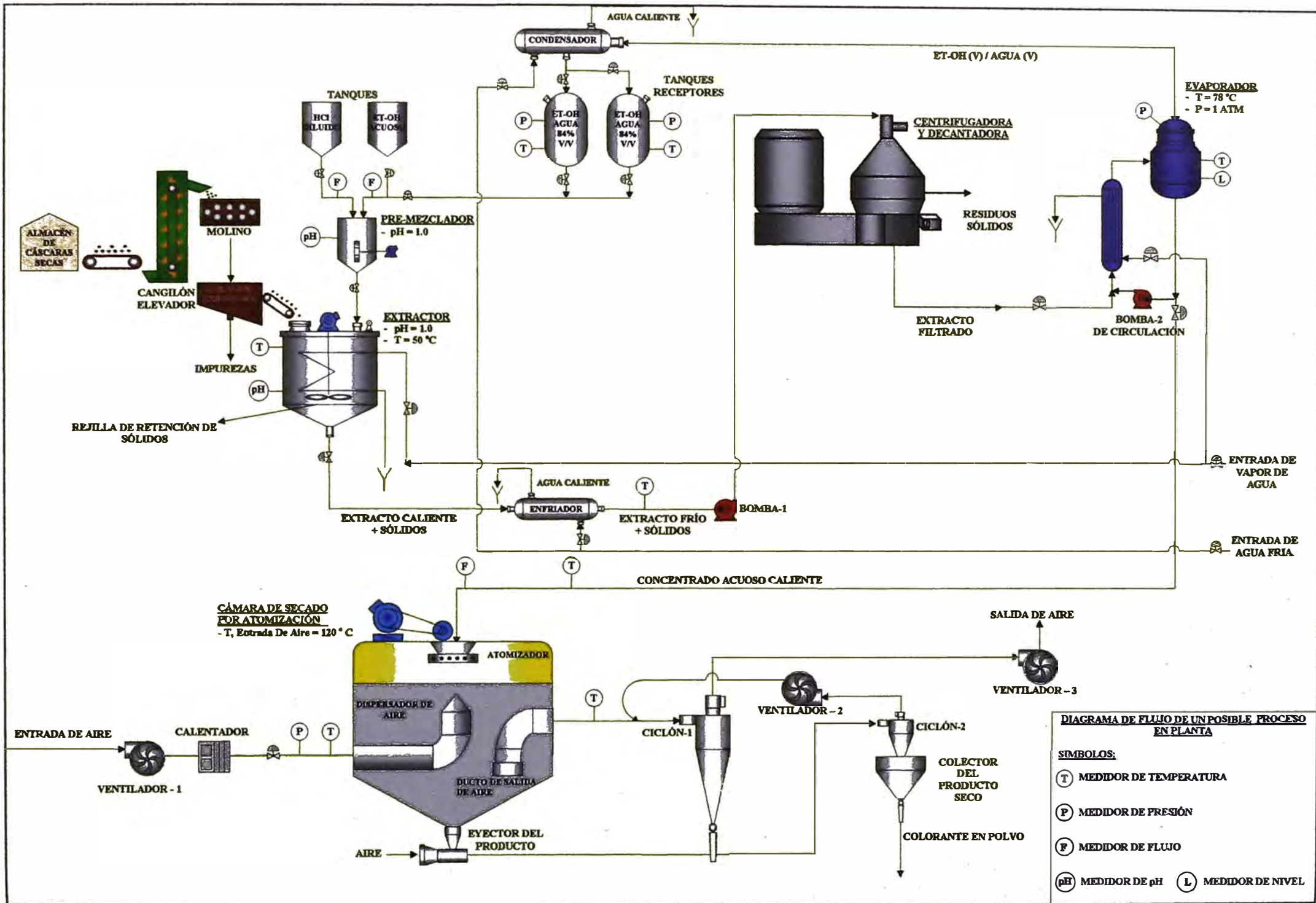
La solución que consiste de colorante en Et-OH acuoso, empieza a ebullición a 78 °C, que es la temperatura de ebullición del Et-OH puro, pero el alcohol que empieza a evaporarse es acompañado de agua, y de los múltiples ensayos realizados en laboratorio se puede afirmar que el Et-OH obtenido siempre es de 84°, además éste proceso de concentración se recomienda que se realice mediante una rotación de la solución, algo análogo al proceso de laboratorio de concentración con rota-vapor, que atenúa la violenta reacción de la solución cuando se llega a la temperatura de ebullición, en el proceso se puede lograr mediante una bomba de recirculación, como lo muestra el diagrama.

El vapor de Et-OH pasa por un condensador simple y de ahí a unos tanques receptores donde se almacena el alcohol acuoso para la posterior preparación de la solución extractora, tal y como se muestra en el diagrama.

La concentración se realizará hasta obtener más o menos un volumen del 30-35% del inicial lo que se monitoreará con un medidor de nivel, luego el concentrado acuoso esta listo para su posterior tratamiento.

4.6 SECADO.

La solución caliente, pasará a un equipo de secado por spray dryer pero en éste caso se trata de un equipo a gran escala, cuyo atomizador será accionado por un motor y el aire será suministrado por medio de compresores y calentadores para obtener un flujo y temperatura adecuados, que en este proceso se recomienda de 120 °C para entrar a la cámara de secado, luego del secado el colorante en polvo es arrastrado a unos ciclones donde después pasará a un colector del producto seco.



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 1. En este primer estudio que se desarrolló con la variedad 1, se trabajó con el exocarpo de la baya (piel). Ahora si se desea estudiar las otras dos variedades, es recomendable tomar en cuenta también el endocarpo leñoso (es decir, la cáscara completa), ya que muestran cantidades importantes de colorante.**
- 2. En vista de que la Mishquipanga es una planta silvestre, los distintos lugares donde se desarrolla hacen que el fruto maduro difiera en contenido de metabolitos, en éste caso el colorante era de cantidades variables en las cáscaras puesto que los lotes que enviaban eran de frutos cosechados de distintas zonas y por ende de diferentes condiciones de crecimiento. Se recomienda realizar el estudio con frutos cosechados de un mismo lugar, para realizar la evaluación más uniformemente.**
- 3. El muestreo de bayas sometidas a investigación, fue realizado en el Dpto. de San martin – Moyobamba, y en vista de que es un fruto silvestre y por lo tanto no hay áreas determinadas para su siembra y cosecha, las muestras fueron colectadas de distintos puntos de los bosques donde crece naturalmente, y aunque ya se han hecho algunas simples pruebas de sembrío en Lima, se sugiere seguir buscando un lugar, en nuestra capital, donde se reúnan las condiciones apropiadas para su sembrío y así poder tener más adelante muestras con mayor homogeneidad, sobre todo en su contenido de colorante.**
- 4. Se puede realizar el secado de las cáscaras en Lima en tiempo de verano, en campo abierto la temperatura puede llegar a 40-42°C. Aproximadamente el secado, de esa forma, demore un día y medio (que así demoraron en secar las cáscaras de la variedad 1) o tal vez demande más tiempo, sobre todo para el caso de las variedades 2 y 3, que son las que mayor porcentaje de humedad presentan.**

5. Debe recordarse siempre que el ID es el cociente de las T Acys calculadas por el método de pH simple entre las calculadas por el método de pH diferencial, por lo tanto, simplemente puede ser uno o mayor que uno, durante todo el trabajo de investigación se tuvieron valores desde 0.95 hasta 1.2 aprox. Aunque puede ser más, si la degradación continua, pero para una interpretación más clara sobre éste indicador, se puede decir:

$0.95 \leq ID < 1.05 \Rightarrow$ No hay Acys degradadas, se puede aplicar el M. de pH simple.

$1.05 \leq ID \Rightarrow$ Aparecen Acys degradadas, debe aplicarse el M. de pH diferencial.

6. El blanco que fue agua destilada en lugar del buffer pH 1.0, en la medición del O.D. de los analitos, no afecta a los resultados, tal vez porque en el caso del buffer pH 1.0, es una solución acuosa, que tiene HCl bien diluido y KCl y se llega a pH 1.0 por la presencia de los iones Cl^- y K^+ que aumentan la actividad de los iones H^+ , por la ley de Debye Hückel.
7. A pesar que el presente estudio se realizó con Etanol acuoso, como solvente en la extracción, se puede realizar un estudio con otros solventes, siempre que sustenten los propósitos del estudio.
8. Como se puede observar en los gráficos del efecto de la relación Solvente/Cáscara, que la extracción a 70°C es más rápida que la de 50°C , pero se puede mejorar éste último usando múltiples etapas, para mejorar el rendimiento.
9. El extracto contiene otros metabolitos aparte de la Acys, lo cual se muestra en el cromatograma de antocianidinas aisladas, entonces sería interesante realizar una purificación del concentrado, por cromatografía en papel, en columna con un adsorbente como Sílica Gel o intercambio iónico, etc., para conocer los otros compuestos y tener la certeza de que el pigmento se puede secar directamente, sin problema de que el producto pudiera ser tóxico para el ser humano.

10. Seguidamente de la purificación de Acys pueden identificarse individualmente, usando reactivos de desplazamiento del $\lambda_{\text{máx}}$, según se realizó con las Acys del Camu-Camu (Ing. Rosario Pella).
11. En el Destilador–Rotavapor, siempre se llega a obtener un destilado de etanol acuoso de 84°, entonces se puede preparar una solución con 62.4% en volumen usando Et-OH 84°-HCl 0.9N (75:25) y así conservar un pH cerca de 1.0.
12. Se ha demostrado que una mejor extracción, se logra con Et-OH acuoso a un 62.4% aproximadamente, y también se puede observar ésta conclusión en otros trabajos realizados de Acys como “Optimization Of Extraction Of Anthocyanins From Black Currants With Aqueous Ethanol” - J.E. Cacace y G. Mazza – JOURNAL OF FOOD SCIENCE, Vol. 68, No.1, 2003. Puede tomarse ésta relación como base para otros trabajos de Investigación sobre Acys.
13. En el desplazamiento de la $\lambda_{\text{máx}}$ al agregar una solución etanólica al 1% de AlCl_3 , en el espectro de las antocianidinas, cabe aclarar que se usa AlCl_3 anhidro, cuya característica principal es ser fumante, y no el $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, puesto que la introducción de las moléculas de agua impiden la formación del Quelato, de la antocianidina con el Al.
14. Así mismo, si se desea comparar el espectro de una antocianidina desconocida con los espectros Standard de las principales antocianidinas, por lo general se usa un medio como metanol o etanol, con 0.01% de HCl, esto no significa que se debe agregar esa cantidad usando el HCl comercial, es decir de 37%, porque tiene agua y no permitirá observar el espectro nítido; para tener un buen espectro a comparar, es suficiente diluir en Etanol o Metanol grado reactivo.
15. Los espectros Standard de las principales antocianidinas, que se muestran en la sección 1.2.2.9.C, han sido ploteados a una escala aproximada, aunque es suficiente con aquellos sólo para comparar la forma del espectro de cada una de las antocianidinas con una muestra desconocida.

16. Las Acys son conocidas por ser antioxidantes, sería interesante cuantificar la *Capacidad Antioxidante* de las Acys de la mishquipanga y compararlas con antioxidantes conocidos, como el β -Caroteno, Vitamina E, Vitamina C, etc.
17. Se recomienda que si se desarrollara un proceso industrial para la extracción, éste sea semi-batch, puesto que si se mantiene éste un tiempo prolongado a altas temperaturas, los compuestos de degradación pueden acumularse y proliferar la degradación de los demás componentes.
18. Puede, desarrollarse un método para la determinación más exacta de las T Acys de la mishquipanga, siguiendo el principio de Fuleki y Francis ¹³, lo cual implicaría aislar cada una de las diferentes Acys y determinar la absorptividad o Coeficiente de Extinción k , a una determinada longitud de onda (cerca del $\lambda_{m\acute{a}x}$), una determinada concentración y una determinada longitud de celda, de cada una de las Acys más importantes, es decir, que se encuentren en mayor cantidad, ya que puede haber algunas que estén en pobres proporciones y que no afecten el k . Siendo :

$$k = \frac{A}{l * c}$$

- l , longitud de la trayectoria de la radiación, puede estar en cm o en otra unidad de longitud.
- c , concentración que puede estar en g/L o en otras unidades de concentración especificadas.

En el estudio de las Acys de Cr, se usa $E_{1cm}^{1\%}$, que es el coeficiente de extinción de una solución al 1%, en un camino de 1 cm y es la manera más corriente de usarlo en la práctica.

19. En la sección 2.5 de secado se observa que la mayor pérdida de masa de T Acys se produce en la etapa de secado por aspersion, entonces se debe trabajar en la disminucion de las pérdidas producidas por el equipo de secado por atomización, manejando parámetros como:

velocidad del atomizador, recirculación de producto, etc. Aunque se presenta otras técnicas de secado en la presente tesis y con mejores resultados sobre el rendimiento, el secado por atomización no debe descartarse, sino tratar de mejorar el equipo para que pueda trabajar a su máxima capacidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abe Y. y Hayashi K. "Botan. Mag. 69". 577 Pág. Tokio. Edición 1956.
2. Bentley, K. W. "The Natural Pigments". Pág. 42-45. Interscience Publ., New York. Edición 1960.
3. Blank, F. "Botan. Rev. 13". 241 Pág. Edición 1947.
4. Blank, F. "Handbuch der Pflanzenphysiologie". Volumen 10. Editorial Ruhland, W. Pág. 300-353. Berlin, Alemania. Edición 1958.
5. Brouillard, R.; Iacobucci G. A. y Sweeny J.G. "J. Amer. Chem. Soc. 104". 7585 Pág. Edición 1982.
6. Dickinson, D. y Gawler, J. H. "The chemical constituents of Victoria plums: chrysanthemine, acid and pectin contents. J. Sci. Food Agr. 7". Pág. 699-705. Edición 1956.
7. Dilthey, W. y Quint, F. "J. Prakt. Chem.". 131 Pág. Edición 1931.
8. E. C. Bate-Smith. "Nature 161". 835 pág. Edición 1948.
9. E. C. Bate-Smith. "Biochem. Soc. Symposia 3". 62 pág. Edición 1949.
10. E. C. Bate-Smith. "Biochem. J. 58". 122 pág. Edición 1954.

11. Finar, I. L.; "Química orgánica II: Estereoquímica y química de los productos naturales". Editorial Alhambra S. A. 2 da Edición Española, 1970. Madrid-España. Pág. 771-799.
12. Fuleki, T. "Development of quantitative methods for individual anthocyanins in cranberry and cranberry products". Ph.D. Thesis. Universidad de Massachusetts, Amherst, Massachusetts. Biblioteca de la Universidad de Microfilms, publicación No. 67-7887. 1967.
13. Fuleki, Tibor; Francis, F.J.; "Quantitative methods for anthocyanins: 1. extraction and determination of total anthocyanin in cranberries". Journal of food science-Volume 33, 1968. Pág. 73-77.
14. Fuleki, Tibor; Francis, F.J.; "Quantitative methods for anthocyanins: 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice". Journal of food science-Volume 33, 1968. Pág. 78-83.
15. Geissman, T.A. y Hinreiner, E. "Bot. Rev. 18", 77 Pág. Edición 1952.
16. Geissman, T.A. "Moderne Methoden d. Pflanzenanal 3". Pág. 450, 474. Edición 1955.
17. Goodwin, T. W.; "Chemistry and biochemistry of plant pigments". Vol. 1. Capítulo 8. 1976. 2 da. Edición. Pág. 425-463.
18. Goodwin, T. W.; "Chemistry and biochemistry of plant pigments". Vol. 1. Capítulo 16. 1976. 2da. Edición. Pág. 736-777.

19. Goodwin, T. W.; "Chemistry and biochemistry of plant pigments". Vol. 1. Capítulo 20. 1976. 2da. Edición. Pág. 166-206.
20. Graebe, J. y Liebermann, F. "Ber. Dt. Chem. Ges. 1". 106 Pág. Edición 1868.
21. Harborne J. B. "Spectral methods of characterizing anthocyanins. Biochemical J. 70". Pág. 22-28. Edición 1958.
22. Harper, K. A. y Chandler B. V. "Austral. J. Chem. 20". Pág. 731, 745. Edición 1967.
23. Hayashi K., "Acta Phytochim.", Japón. 7, 117, 143, 1933; Ibid. 8, 65, 179, 1934; Ibid. 9, 1, 1936.
24. Hayashi, Kozo; "The chemistry of flavonoid compounds"; Capítulo 9: The anthocyanins. Editorial T. A. Geissman, 1962. Pergamon Press. N.Y. and Oxford. Pág. 248-283.
25. Hrazdina, G. y Franzese A. J. "Phytochemistry 13". 231 Pág. Edición 1974.
26. Iacobucci, Guillermo A.; Sweeny, James G. "Tetrahedron". Vol. 39, Nº 19. 1983. Pág. 3005-3038.
27. Jurd, Leonard; "The chemistry of flavonoid compounds"; Capítulo 5: Spectral properties of flavonoid compounds. Editorial T. A. Geissman, 1962. Pergamon Press. N.Y. and Oxford. Pág. 107-155.

28. Jurd, L. "Anthocyanins and related compounds". I. Structural transformation of flavylum salts in acidic solutions. *J. Org. Chem.* 28, Pág. 987-991. Edición 1963.
29. Karrer, P. "Kleins Handbuch d. Pflanzenanalyse 3". Pág. 851,959. Edición 1932.
30. Lock Sing de Ugaz, Olga; "Colorantes naturales"; Fondo Editorial De La PUCP, 1997. Lima.
31. Markham, K. R., Mabry, T. J. y Thomas, M.B. "The Systematic Identification of Flavonoids". Springer Verlag, Berlin. Edición 1970.
32. Marquat, L. C. "Eine Chemisch-physiol. Abhandlung". Bonn. Edición 1835.
33. Mc. Clelland, R. A. y Mc. Gall G. H. "J. Org. Chem. 47". 3730 Pág. Edición 1982.
34. Mostacero León, José; Mejía Coico, Freddy. "Taxonomía de fanerogamas peruanas". Editorial Libertad E.I.R.L. 1era. Edición 1993. Pág.501-502. Trujillo-Perú.
35. Mostacero León, José; Mejía Coico, Freddy; Gamarra Torres, Oscar. "Taxonomía de las fanerogamas útiles del Perú". Volumen 2. Editorial Normas Legales S.A.C. Edición 2002. Pág. 1065-1069. Trujillo-Perú.
36. Niebes P. y Janot, J. "Bull. Roy. Soc. Liege 39". 525 Pág. Edición 1970.

37. Noller, Carl R.; "Química Orgánica". Editorial Nueva Editorial Interamericana, S. A. de C.V. Tercera edición, 1968. Traducido en español de la edición original de la obra "Text of Organic Chemistry, by Carl R. Noller". 1966. Pág. 448 y 449.
38. Otha, H.; Akuta, S. y Osajima Y. "Nippon Shokuhin-Kogyo Gakkaishi 27". 81 Pág. Edición 1980.
39. Pella Leyva, M. "Estudio de separación del colorante del camu-camu". Tesis para optar por el título de ingeniero químico. Universidad Nacional De Ingeniería. 2004. Lima-Perú.
40. Perry, Robert; Green, Don. "Perry's Chemical Engineers' Handbook". Sección 2: Physical and Chemical Data. McGraw-Hill. 7 ma. Edición 1999. Pág. 2-112, 2-235.
41. Preston, N. W. y Timberlake C. F. "J. Chromat.". Pág. 214, 222. Edición 1981.
42. Ribéreau-Gayón, P. "Recherches sur les anthocyanes des vegetaux. Application au genre *Vitis*". Tesis Doctoral. Universidad de Bordeaux. 118 pág. Libraire Generale de l'Enseignement. Paris, Francia. Edición 1959.
43. Ribéreau-Gayón, P. "Les Composés Phenoliques du raisin et du vin. Annales de Physiologie Végétale". 79 pág. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris, Francia. Edición 1964.
44. Sondheimer, E. y Kertesz, Z. I. "The anthocyanins of strawberries. J. Am. Chem. Soc. 70". Pág. 3476-3479. Edición 1948.

45. Sondheimer, E. y Kertesz, Z. I. "Anthocyanins pigments. Colorimetric determination in strawberries and strawberry products. Anal. Chem. 20". Pág. 245-248. Edición 1948.
46. Sondheimer E. "On the relation between spectral changes and pH of the anthocyanin pelargonidin-3-monoglucosido". J. Am. Chem.Soc. 75". 1507 pág. Edición 1953.
47. Swain, T. y Hillis, W. E. "The phenolic constituents of *Prunus domestica*. 1. The quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agric. 10". Pág. 63-68. Edición 1959.
48. Timberlake, C. F. y Bridle, P. "Anthocyanins, in developments in Food Colours-1". Editado por J. Walford. Pág. 115-149. Applied Science. Londres. Edición 1980.
49. Willstätter, R. y Everest A. E. "Justus Liebig's AnnIn 401". 189 Pág. Edición 1913.
50. Witt, E. "Ber. Dt. Chem. Ges. 11". 325 Pág. Edición 1888.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **Acys y Acy:** Abreviatura, de las palabras antocianinas y antocianina, en inglés (anthocyanins y anthocyanin, respectivamente).
- **Antocianidina:** Compuesto químico de la familia de los flavonoides, que no contiene ningún sustituyente azúcar en su estructura. También se le nombra aglicona.
- **Antocianina:** Antocianidina, conteniendo sustituyentes azúcares, por eso también lleva el nombre de glicósido.
- **Antocianinas aciladas:** Son antocianinas cuyos sustituyentes son ácidos orgánicos como el ácido cumárico, cafeíco, telúrico, etc.
- **Arilos:** Envoltura que cubre las semillas en algunas plantas.
- **As:** Parte de la hoja expuesta a la luz.
- **BAW:** Fase superior de la solución n-butanol: ácido acético glacial: agua, 4:1:5.
- **Bulbo:** Parte redondeada del tallo subterráneo de algunas plantas.
- **Bu:HCl:** Fase superior de la solución n-butanol: HCl 2N, 1:1.
- **Carpelo:** Parte del fruto que cubre la pulpa para aquellos ciertos tipos de plantas.
- **Cr Acys:** Antocianinas de los arándanos.
- **Cr J:** Jugo de arándanos.
- **Cy-3-Ar:** Cianidina-3-arabinósido
- **Cy-3-Ga:** Cianidina-3-galactósido
- **Endocarpo:** Parte interna del pericarpo que cubre a la pulpa.
- **Envés:** Parte opuesta del frente de la hoja.
- **Et-OH:** Etanol.
- **Exocarpo:** Parte del pericarpo más externa, se le dice también piel.
- **Folíolo:** Cada una de las hojuelas de una hoja compuesta.

- **Forestal:** solución de ácido acético glacial: HCl conc.: agua 30:3:10.
- **Fórmico:** Solución de ácido fórmico: HCl conc.: agua, 5:5:3.
- **ID:** Índice de degradación.
- **Inflorescencia:** Orden o forma con que aparecen colocadas las flores al brotar en las plantas.
- **Metabolito:** Cualquier sustancia que participa en el metabolismo (cambios químicos que ocurren en una célula o un organismo para producir energía y materiales básicos que se necesitan para importantes procesos vitales).
- **OD:** Absorbancia.
- **Pecíolo:** Se le llama así al pezón de la hoja.
- **Pericarpo:** Parte del fruto que cubre a la pulpa.
- **Pn-3-Ar:** Peonidina-3- arabinósido
- **Pn-3-Ga:** Peonidina-3- galactósido
- **Raíces absorbentes:** Mucho más pequeñas que las anteriores, donde la planta toma los nutrientes de los suelos.
- **Raíces reservantes:** parte de la planta donde se almacena los nutrientes para sí misma y para sus hijuelos.
- **Rizoma:** Tallo horizontal y subterráneo.
- **T Acys:** Abreviatura de Antocianinas Totales en inglés (Total Anthocyanins).
- **V Acys:** Velocidad de extracción de antocianinas (mg/min*g c.s.)

APÉNDICE N° 01:
EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS EMPLEADOS

1. Equipos

- Balanza Analítica con 04 dígitos de precisión.
- Equipo de ultravioleta (UV –1601/ UV Visible Spectrophotometer Shimadzu Corp.).
- Refrigeradora.
- Desecador.
- pH-metro Digital.
- Rotavapor Yamato Modelo RE 46.
- Calentador de agua para baño maria - Water Bath BM 42.
- Bomba de vacío Crompton Greaves N° AFG 110017, 0.5 HP, 1725 rpm.

2. Materiales

- Baguetas.
- Bureta de 50 y 10 mL.
- Embudo de vidrio.
- Fiolas de 25, 10 y 5 mL.
- Papel filtro (semilento).
- Pipetas de 5 y 1 mL.
- Vasos de precipitación de 500, 250, 125 y 50 mL
- Viales de 30 y 15 mL
- Pera de decantación.
- Placa de toques.
- Probetas graduadas de 50 y 100 mL.
- Tubos de ensayo.
- Pipetas pasteur.
- Succionadores.

3. Reactivos

- Alcohol etílico 96 %.
- Ácido clorhídrico 12 N (comercial).
- Hidróxido de sodio perlas.
- Ácido Clorhídrico grado reactivo.
- Tricloruro de aluminio hidratado.
- Metanol PA.
- Etanol PA.
- Iso-pentanol (alcohol iso-amílico) PA.
- Alcohol n-butílico PA.
- Ácido acético glacial.
- Ácido fórmico.

Apéndice No. 2



REGISTRO DE LA
PROPIEDAD INDUSTRIAL

ESPAÑA

① N.º de publicación: ES 2 011 887

② Número de solicitud: 8803412

⑤ Int. Cl.⁴: A23L 1/275

C09B 61/00

⑫

PATENTE DE INVENCION

A6

② Fecha de presentación: 10.11.88

③ Titular/es: Institut Bioorganicheskoi
Khimii Akademii Nauk Uzbekkoi SSR
Prospekt M. Gorkogo, 83 Tashkent, SU

④ Fecha de anuncio de la concesión: 16.02.90

⑦ Inventor/es: Karimdzhanov, Akbar;
Rakhimkhanov, Zukretdin B.; Sadykov, Abid;
Ismailov, Amindzhan;
Mukhamedova, Fatima Khisamovna;
Khozhimatov, Kakhkhor;
Martynova, Susanna Anatolievna;
Rasulova, Aziza; Zykova, Alevtina I.;
Islambekov, Shafkat Juldashaevich;
Masudov, Amanulla Sagdullaevich y
Salikhov, Surat Akramovich

⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.02.90

⑧ Agente: Elzaburu Márquez, Fernando

④ Título: Un método para obtener colorante alimenticio a partir de la materia vegetal.

⑤ Resumen

Un método de obtención del colorante alimenticio a partir de la materia vegetal que consiste en que la extracción de las antocianinas de los residuos de frutos de plantas que contienen antocianinas se hace con una solución en agua-etanol, acidificada hasta un pH no superior a 3,5 luego el extracto obtenido de los residuos se utiliza para hacer una extracción secundaria de antocianinas de las flores de plantas que contienen antocianinas, separándose ulteriormente el extracto secundario, o la extracción primaria de antocianinas de las flores de plantas que contienen antocianinas se hace con una solución acuosa acidificada hasta un pH no superior a 3,5, se concentra el extracto obtenido y se mezcla en proporción 1:4-5 con el extracto

mencionado de los residuos, concentrado previamente; luego, se separa el producto acabado, introduciendo tanino en la mezcla obtenida o mediante concentración del extracto secundario mencionado en presencia de tanino.

DESCRIPCION

La presente invención tiene relación con la industria alimentaria y, más en particular, se refiere a un método para obtener colorante alimenticio a partir de la materia vegetal, que encuentra aplicación en la industria alimentaria para dar color a artículos de confitería, bebidas no alcohólicas, embutidos, así como para imponer marcas a canales de carne y otros productos, y también en las industrias farmacéuticas y de perfumería.

Son conocidos métodos de obtención de colorantes alimenticios a base de antocianinas, obtenidas de residuos o jugos de moras, uvas, ciruelas o guindas, y que se utilizan para dar color a los artículos de confitería o a las bebidas no alcohólicas. Los colorantes mencionados son obtenidos por medio de extracción con agua de antocianinas procedentes de los residuos o jugos de dichos frutos en presencia de anhídrido sulfuroso o ácido clorhídrico (documentos de patente FR-A 2331615, 2260620 y 2299385; SU-A 126570 y 231051). Es conocido un método de obtención de un colorante alimenticio a base de la antocianina extraída de las flores de malvarrosa de la especie Alcea y de la familia Malvaceae (SU-A, 704971 y 571492).

El método de obtención del colorante mencionado consiste en que las flores de malvarrosa se someten a extracción con una mezcla de acetona: agua, siendo la proporción de 1:1, a una temperatura de 50-55°C; o con una solución acuosa al 1% de ácido cítrico a una temperatura de 40°C. La proporción de la materia vegetal y del agente extractor es igual a 1:50. El extracto obtenido es separador y concentrado. El contenido de las antocianinas en el producto acabado es de 36 g/l.

Los colorantes alimenticios obtenidos de acuerdo con los métodos mencionados se caracterizan por una estabilidad empeorada durante el almacenamiento en estado puro y también en los artículos en los cuales están presentes dichos colorantes. Además, la gama de matices de los colorantes alimenticios mencionados es limitada. Todo lo señalado limita el campo de aplicación de los colorantes mencionados. Los métodos de obtención de los colorantes mencionados no permiten realizar una extracción completa y selectiva de las antocianinas. Además, el uso de un disolvente orgánico tóxico (acetona) complica la tecnología del proceso.

La invención está basada en el problema de desarrollar, modificando las condiciones de extracción de la materia vegetal, un método que permita obtener, a partir de la materia vegetal, un colorante alimenticio que sea de buena calidad y estable, permita obtener una amplia gama de matices, y encuentre un amplio campo de aplicación, lo que permita utilizar desechos vegetales de la industria alimentaria.

El problema planteado se resuelve porque, en el método de obtención de colorante alimenticio a partir de la materia vegetal, que incluye una extracción de antocianinas de la materia vegetal que contiene antocianinas, una separación del agente extractor seguida por la obtención del producto acabado a partir de este agente, de acuerdo con la invención, se efectúa una extracción de antociani-

nas de los residuos de frutos de plantas que contienen antocianinas con una solución en agua-etanol acidificada hasta un pH no superior a 3,5, luego el extracto obtenido de los residuos se usa para hacer una extracción secundaria de antocianinas de las flores de plantas que contienen antocianinas, y luego se separa el extracto secundario; o se efectúa una extracción primaria de antocianinas de las flores de plantas que contienen antocianinas con una solución acuosa, acidificada hasta un pH no superior a 3,5, se condensa el extracto obtenido y se mezcla éste en la proporción de 1:4,5 con el mencionado extracto obtenido a partir de los residuos, concentrado con anterioridad, y luego se separa el producto acabado, introduciendo tanino en la mezcla obtenida, o concentrando el extracto secundario obtenido en presencia de tanino.

El método reivindicado permite mejorar la calidad del producto acabado (aumentar el contenido de las antocianinas hasta un 12,5% en masa).

Es ventajoso que se utilicen, como frutos de plantas que contienen antocianinas, los residuos de moras de la planta *Morus nigra* o uvas de *Vitis vinifera*, que son desechos industriales. Tal previsión permite hacer ventajoso económicamente al método mencionado.

Como flores de plantas que contienen antocianinas se emplean, con preferencia, las flores de malvarrosa *Alcea Rosea* o las flores de formas híbridas de hibisco *Hibiscus* spp., puesto que se caracterizan por un alto contenido de antocianinas, hasta de 10% en masa.

Con el fin de obtener colorante alimenticio con alto contenido de antocianinas es ventajoso que el extracto secundario separado sea mezclado con el jugo de moras de la planta *Morus nigra*.

Para obtener el colorante alimenticio para artículos de confitería, embutidos y bebidas no alcohólicas, es ventajoso que la extracción de los residuos estrujados de moras de la planta *Morus nigra* o de uvas de la especie *Vitis vinifera* se haga con una solución acuosa al 20-25% de etanol, acidificada hasta un pH igual a 2,7-3,0, luego el extracto obtenido se utilice para extraer antocianinas de las flores de malvarrosa o de las formas híbridas de hibisco, se mezcle el extracto separado con el jugo de frutas de mora, y la mezcla obtenida sea concentrada a la temperatura de 65-70°C en presencia de tanino, hasta que se obtenga el producto acabado.

Las condiciones descritas de realización del método reivindicado permiten extraer la máxima cantidad de antocianinas de la materia vegetal, incluso glicósidos de cianidina, que permiten el uso mencionado del colorante reivindicado.

Para obtener el colorante alimenticio con el fin de imponer marcas sobre canales de carne es ventajoso hacer la extracción de orujos de uva de *Vitis vinifera* con una solución al 25-35% de etanol, acidificada hasta un pH igual a 2,7-3,0, concentrar el extracto obtenido hasta un contenido de sustancia seca igual a 36-42%, hacer la extracción de las flores de malvarrosa o de las formas híbridas de hibisco con una solución acuosa al 1,5-2% de ácido cítrico, y concentrar el extracto hasta un contenido de sustancia seca igual a 42-45%; mezclar el extracto condensado obtenido con el extracto mencionado de orujo en proporción igual a 1:4-

5 respectivamente, añadir tanino a la mezcla y obtener así el producto acabado.

La realización descrita del método reivindicado permite extraer la máxima cantidad de antocianinas tales como glucósidos de petunidina y malvidina. Los glucósidos mencionados se fijan con las proteínas de la carne en presencia de tanino, dando un dibujo estable y claro de la marca con un color rojo oscuro.

El método reivindicado, de obtención del colorante alimenticio, es realizado de la manera siguiente: los residuos exprimidos de los frutos de plantas que contienen antocianinas se someten a extracción con etanol acuoso acidificado.

Como residuos exprimidos de los frutos de plantas que contienen antocianinas se utilizan los residuos exprimidos de las especies negras de uvas, ciruelas, guindas y moras. Es preferible que se utilicen residuos de moras de la especie *Morus nigra* o de uvas de *Vitis vinifera*. Como agente extractor, se emplea etanol acuoso, cuya concentración es determinada en función de la extracción completa y selectiva de antocianinas. Para extraer completamente las antocianinas y para que se revele su color, la extracción se realiza en un medio ácido, siendo el valor del pH no superior a 3,5. Luego, se realizan las operaciones tecnológicas necesarias para obtener el colorante alimenticio con un cierto contenido de antocianinas, siendo la secuencia de operaciones la siguiente:

En un caso, el extracto obtenido de los residuos se utiliza por una segunda vez para extraer antocianinas de las flores de plantas que contienen antocianinas, para lo cual se utilizan con preferencia las flores de malvarrosa *Alcea rosea* o las formas híbridas de hibisco *Hibiscus spp.* Con el fin de obtener un colorante alimenticio con un alto contenido de antocianinas, el extracto secundario separado se mezcla con el jugo de moras *Morus nigra*. Luego, el extracto secundario, o su mezcla con el jugo de moras, se concentra en presencia de tanino y se obtiene así el producto acabado. En otro caso, se concentra el extracto obtenido a partir de los residuos de frutos de plantas que contienen antocianinas. Luego, la extracción de las antocianinas de las flores de plantas que contienen antocianinas se hace con una solución acuosa acidificada hasta un pH no superior a 3,5. El extracto obtenido es separado y mezclado con el extracto concentrado de los residuos, siendo la proporción de 1:4-5. Se añade tanino a la mezcla obtenida y se obtiene el producto acabado.

El producto acabado es obtenido en forma seca o en forma de un concentrado denso.

Para obtener un colorante alimenticio para artículos de confitería, embutidos y bebidas no alcohólicas, es preferible que el proceso sea realizado de la manera siguiente:

Los residuos de uva de *Vitis vinifera* y de moras de la especie *Morus nigra* se someten a extracción con etanol acuoso acidificado hasta un

pH igual a 2,7-3,0. Luego, el extracto obtenido se usa para extraer por segunda vez las antocianinas de las flores de malvarrosa *Alcea rosea* o de las formas híbridas de hibisco *Hibiscus spp.* El extracto enriquecido obtenido es mezclado con el jugo de frutas del moral *Morus nigra*, que es el desecho del proceso de obtención de semillas para la producción de bómbrices (gusanos de seda). Luego, se hace la operación de concentración en presencia de tanino.

El hecho de que el extracto, obtenido de los residuos de frutos de las especies negras de moras y de uvas, se utilice como agente extractor para extraer antocianinas de las flores de malvarrosa o de las formas híbridas de hibisco, conduce a que se aumente el contenido de las antocianinas de las que se compone el colorante. El mezclado del extracto con el jugo de moras *Morus nigra* permite aumentar la cantidad de antocianinas, incluso la de glucósidos de cianidina, en el producto acabado, lo que le comunica ciertos matices de color.

El hecho de que se concentre el extracto reunido en presencia de tanino, que es un buen agente antioxidante y estabilizador, permite evitar las pérdidas de antocianinas debidas a su descomposición durante la operación de concentración.

Para obtener el colorante alimenticio a fin de imponer marcas sobre canales de carne es preferible que el proceso se realice de la manera siguiente:

La extracción de los residuos de orujo de uvas de *Vitis vinifera* se hace con etanol acuoso al 25-35%, acidificado hasta un pH igual a 2,7-3,0. La concentración mencionada de etanol acuoso permite hacer una extracción completa y selectiva de antocianinas difícilmente solubles (glucósidos de malvidina y petunidina).

El extracto obtenido es concentrado hasta que el contenido de sustancia seca se haga igual a 36-42%, y luego se hace la extracción de flores de malvarrosa con una solución acuosa al 1-2% de ácido cítrico, concentrando seguidamente hasta que el contenido de sustancia seca se haga igual a 42-45%, y se mezcla con el extracto concentrado obtenido de orujo de uvas, siendo la proporción de 1:4-5. Se añade 3-6% de tanino a la mezcla obtenida de los extractos concentrados. La cantidad mencionada de tanino asegura la fijación del colorante con la proteína de la carne. El método permite obtener un colorante de un color saturado rojo oscuro, en forma de pasta, estable frente a variaciones de temperatura. El método propuesto permite mejorar considerablemente la calidad del colorante alimenticio procedente de las plantas que contienen antocianinas (se hace llegar al contenido de antocianinas hasta un 12,5% en masa).

El colorante alimenticio obtenido es el extracto obtenido de la materia vegetal que contiene antocianinas y consiste en los siguientes componentes, en % en masa:

5

2 011 887

6

glucósidos	
de cianidina	0,2-6,4
glucósidos	
de peonidina	0,1-5,3
glucósidos	
de delphinidina	0,1-4,0
glucósidos	
de petunidina y/o	0,05-1,5
glucósidos	
de malvidina	0,1-3,6
flavonoles	1,0-6,0
tanino	1,0-14,0
ácidos	
orgánicos	28,0-43,0
sales minerales,	
microelementos	
polisacáridos	el resto.

El colorante alimenticio de acuerdo con el método mencionado puede ser obtenido, dependiendo del campo de aplicación, en forma seca o en forma de un concentrado denso. El colorante alimenticio en forma seca es un producto en polvo, de color púrpura-rojo, soluble en agua, de sabor ácido y dotado de un aroma agradable de frutas.

El colorante alimenticio en forma del concentrado denso es un líquido espeso parecido al jarrabe, de color desde rojo oscuro a carmesí oscuro, de sabor ácido, dotado de un aroma de frutas en combinación con un aroma de flores de malvarrosa.

Para mejor comprender la presente invención, se presentan a continuación las siguientes realizaciones del método de obtención de un colorante alimenticio.

Ejemplo 1

6 kg de residuos de moras y 1,2 kg de orujo de uva se someten a extracción con 100 litros de etanol acuoso al 25% que contiene 0,7% de ácido acético y 0,7% de ácido cítrico (pH=2,7), a la temperatura del medio ambiente, hasta que se extraigan antocianinas en una cantidad de 3,0 g/l. Se obtienen 80 litros del extracto, siendo el contenido de antocianinas de 3,0 g/l.

Luego, el extracto obtenido se usa para hacer una extracción secundaria de 3 kg de flores de malvarrosa *Alcea rosea*, para extraer las antocianinas en una cantidad de 5,3 g/l. Se obtienen 60 litros de un extracto secundario, siendo el contenido de antocianinas de 5,3 g/l.

Se añaden al extracto secundario 0,005 kg de tanino y se concentra a una temperatura de 65-70°C en un vacío de 620-650 mm de columna de mercurio, secando seguidamente. Se obtienen 2,3 kg de producto acabado, que es un polvo de color rojo oscuro, de sabor ácido y de aroma agradable

de frutas, que contiene 11,2% en masa de antocianinas. El colorante alimenticio obtenido, que se usa para artículos de confitería y embutidos, tiene la siguiente composición en % en masa:

5

g ^h	
de cianidina	4,70
glucósidos	
de delphinidina	1,10
glucósidos	
de peonidina	3,70
glucósidos	
de malvidina	1,30
glucósidos	
de petunidina	0,40
flavonoles	1,50
tanino	1,80
ácidos	
orgánicos	32,00
sales minerales,	
microelementos,	
polisacáridos	el resto

10

15

20

25

30

35

El colorante mencionado se utiliza para fabricar caramelos "monpaclé", en una cantidad de 0,45% en masa. El colorante da un color estable rojo a los caramelos.

El colorante mencionado también se utiliza para fabricar mortadelas en una cantidad de 0,6% en masa. El colorante da a la mortadela un color rosado estable.

Ejemplo 2

3 kg de orujo de uva y 4 kg de residuos de moras se someten a extracción en 250 litros de etanol acuoso al 20%, que contiene 0,6% de ácido acético y 0,8% de ácido cítrico (pH=2,7) a la temperatura del medio ambiente. Se obtienen 285 litros del extracto, siendo el contenido de antocianinas 1,3 g/l. El extracto obtenido se usa para hacer la extracción secundaria de 9 kg de flores de malvarrosa hasta que el contenido de las antocianinas en el extracto sea igual a 5,6 g/l. Se obtienen 150 litros del extracto secundario con un contenido de antocianinas igual a 5,6 g/l. Se añaden al extracto secundario obtenido 0,009 kg de tanino y se concentra a una temperatura de 65-70°C al vacío de 620-650 mm de columna de mercurio, secando ulteriormente el extracto concentrado.

Se obtienen 5,1 kg del producto acabado, que es un polvo de color rojo oscuro, de sabor ácido y de aroma agradable a frutas, que contienen 11,3% en masa de antocianinas. El colorante alimenticio obtenido, que se usa para fabricar bebidas no alcohólicas, tiene la siguiente composición, en porcentaje en masa:

60

7

2 011 887

8

glucósidos de cianidina	4,90
glucósidos de delphinidina	1,00
glucósidos de peonidina	3,80
glucósidos de malvidina	1,20
glucósidos de petunidina	0,30
flavonoles	1,90
tanino	2,00
ácidos orgánicos	35,00
sales minerales, microelementos, polisacáridos	el balance

El colorante obtenido se usa para fabricar una bebida tónica, en una cantidad de 1,8 kg por 100 decalitros de la bebida. El colorante da a la bebida un colorido rosado estable, de sabor y olor agradables de frutas.

Ejemplo 3

Se obtiene el colorante alimenticio, como se ha descrito en el ejemplo 2. A 145 litros del extracto obtenido se añaden 26 litros de jugo de moras *Morus nigra*. Se introducen 0,01 kg de tanino en la mezcla obtenida y se concentra a una temperatura de 65-70°C al vacío de 620-650 mm de columna de mercurio secando seguidamente.

Se obtienen 7,9 kg del producto acabado, que es un polvo de color rojo oscuro, de sabor ácido y de aroma agradable de frutas, que contiene 11,2% en masa de antocianinas.

Ejemplo 4

3 kg de orujos de uva se someten a extracción en 170 litros de etanol acuoso al 25%, que contiene 0,6% de ácido acético, 0,7% de ácido cítrico (pH=2,7), a la temperatura del medio ambiente.

Se obtienen 130 litros de extracto con un contenido de antocianinas igual a 1,36 g/l. El extracto obtenido se usa para hacer la extracción de 5 kg de flores de malvarrosa *Alcea rosea* hasta que se extraiga un contenido de antocianinas igual a 5,4 g/l. Se obtienen 90 litros del extracto con el contenido de antocianinas igual a 5,4 g/l.

Se añaden 0,006 kg de tanino al extracto obtenido y se concentra a una temperatura de 65-70°C al vacío de 620-650 mm de columna de mercurio secando seguidamente. Se obtienen 2,8 kg de un producto acabado que es un polvo de color rojo oscuro, de sabor ácido, de aroma agradable de frutas, que contiene 12,5% en masa de anto-

cianinas. El colorante alimenticio obtenido, que se usa para los artículos de confitería, tiene la siguiente composición, en porcentaje en masa:

glucósidos de cianidina	4,30
glucósidos de delphinidina	0,86
glucósidos de peonidina	4,80
glucósidos de malvidina	1,85
glucósidos de petunidina	0,69
flavonoles	1,70
tanino	2,10
ácidos orgánicos	32,00
sales minerales, microelementos, polisacáridos	el resto

El colorante mencionado, en una cantidad de 0,32% en masa, se utiliza para fabricar una pasta de fruta, en una cantidad de 0,48% en masa, para fabricar mermelada. La pasta obtenida tiene un color rosado estable y la mermelada, posee un color rojo estable.

Ejemplo 5

3 kg de residuos obtenidos de moras y 2,5 kg de orujos de uva se someten a extracción en 240 litros de etanol acuoso al 25% que contiene 0,6% de ácido acético y 0,8% de ácido cítrico (pH=2,7), a la temperatura del medio ambiente hasta que el contenido extraído de antocianinas sea igual a 3,2 g/l. Se obtienen 180 litros del extracto con un contenido de antocianinas igual a 3,2 g/l. Luego, el extracto obtenido se usa para hacer una extracción secundaria de 8 kg de flores de formas híbridas de hibisco *Hibiscus* spp., hasta que el contenido de antocianinas extraídas sea igual a 5,5 g/l. Se añaden al extracto obtenido 0,01 kg de tanino y se concentra a una temperatura de 65-70°C al vacío de 620-650 mm de columna de mercurio, secando seguidamente. Se obtienen 3,9 kg del producto acabado que es un polvo de color rojo oscuro, de sabor ácido y de aroma agradable de frutas, que contiene 9,2% en masa de antocianinas.

El colorante alimenticio obtenido, que se usa para dar color a artículos de confitería y a bebidas no alcohólicas, tiene la siguiente composición en porcentaje en masa:

9

glucósidos de cianidina	5,40
glucósidos de peonidina	0,86
glucósidos de delphinidina	0,94
glucósidos de malvidina	1,50
glucósidos de petunidina	0,50
flavonoles	2,30
tanino	1,60
ácidos orgánicos	34,00
sales minerales, microelementos, polisacáridos	el resto

El colorante mencionado es utilizado para fabricar caramelos, en una cantidad de 0,81% en masa. El colorante da a los caramelos un color rojo oscuro estable.

Ejemplo 6

7,2 kg de flores de malvarrosa son cargados en el aparato extractor y se somete el material a extracción con 190 litros de una solución acuosa al 1,5% de ácido cítrico (pH=2,7) a la temperatura del medio ambiente, hasta que se extraiga la cantidad principal de los colorantes de antocianinas (3,2 g/l). El extracto obtenido es concentrado hasta que el contenido de sustancia seca sea igual a 43% y el contenido de antocianinas, sea igual a 35 g/l.

15 kg de orujos de uva se someten a extracción con 250 litros del etanol acuoso al 30%, que contiene 0,9% de ácido cítrico y 0,4% de ácido acético. Se obtienen 175 litros de extracto con un contenido de antocianinas igual a 3,6 g/l. El ex-

2 011 887

10

tracto obtenido es concentrado hasta que el contenido de sustancia seca sea igual a 38%.

El extracto concentrado, obtenido a partir de orujos de uva, es mezclado con el extracto mencionado de flores de malvarrosa, siendo la proporción de 4:1, se añade tanino, en un 5% de la masa total. El colorante obtenido es un líquido parecido a jarabe, de color rojo oscuro, de sabor ácido y de un olor de frutas. El colorante alimenticio obtenido de carne, que se usa para imponer marcas sobre canales tiene la siguiente composición en porcentaje en masa:

glucósidos de cianidina	0,30
glucósidos de delphinidina	1,10
glucósidos de peonidina	0,70
glucósidos de malvidina	1,40
glucósidos de petunidina	0,31
flavonoles	1,20
tanino	5,30
ácidos orgánicos	17,00
sales minerales, microelementos, polisacáridos	15,0
agua y alcohol etílico	el resto

El colorante mencionado fue utilizado para imponer marcas sobre canales de carne. Se obtuvo un dibujo claro, estable durante el almacenamiento a bajas temperaturas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener colorante alimenticio a partir de la materia vegetal por medio de una extracción de antocianinas de la materia vegetal que contiene antocianinas, una separación del agente extractor seguida por la obtención de él del producto acabado a partir de éste, caracterizado porque la extracción de los residuos de frutos de plantas que contienen antocianinas se hace con una solución de agua-etanol, acidificada hasta un pH no superior a 3,5, el extracto obtenido de los residuos se usa para hacer una extracción secundaria de antocianinas de las flores de plantas que contienen antocianinas, y se separa el extracto secundario; o se efectúa una extracción primaria de antocianinas de las flores de plantas que contienen antocianinas con una solución acuosa, acidificada hasta un pH no superior a 3,5, se concentra el extracto obtenido y se mezcla éste en la proporción de 1:4-5 con el mencionado extracto obtenido de los residuos, concentrado previamente, y luego se separa el producto acabado, introduciendo tanino en la mezcla obtenida o concentrando el concentrado secundario obtenido, en presencia de tanino.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque como frutos de plantas que contienen antocianinas, se utilizan los residuos de moras de la especie *Morus nigra* o de uva de *Vitis vinífera*.

3. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque, como flores de plantas que contienen antocianinas se utilizan flores de malvarrosa *Alcea rosea* o las flores de formas híbridas de hibisco *Hibiscus* spp.

4. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque con el fin de obtener un colorante alimenticio con un alto contenido de antocianinas, el extracto secundario separado es mezclado con jugo de moras de la especie *Morus nigra*.

5. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque con el fin de obtener colorante alimenticio para artículos de confitería, embutidos y bebidas no alcohólicas, la extracción de moras de la especie *Morus nigra* o de uva de *Vitis vinífera* se hace con una solución acuosa al 20-25% de etanol, acidificada hasta un pH igual a 2,7-3,0, el extracto obtenido se utiliza para extraer antocianinas de las flores de malvarrosa o de las formas híbridas de hibisco, y el extracto separado se mezcla con jugo de moras, y luego se concentra la mezcla obtenida a una temperatura de 65-70°C en presencia de tanino, hasta que se obtenga el producto acabado.

6. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque con el fin de obtener colorante alimenticio para imponer marcas sobre canales de carne, la extracción de orujo de uva de *Vitis vinífera* se hace con una solución acuosa al 25-35% de etanol, acidificada hasta un valor de pH igual a 2,7-3,0, el extracto obtenido se concentra hasta que el contenido de substancia seca sea igual a 36-42%, la extracción de flores de malvarrosa o de las formas híbridas de hibisco se hace con una solución acuosa al 1,5-2% de ácido cítrico, concentrando seguidamente hasta que el contenido de substancia seca sea igual a 42-45%, luego, el extracto concentrado obtenido se mezcla con el extracto mencionado de los residuos mencionados, siendo la proporción de 1:4-5, se añade tanin a la mezcla y se obtiene así el producto acabado.

APÉNDICE NO. 3



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 240 796**

⑤① Int. Cl.: **A61K 35/78**
A61K 31/70
A61K 9/14
A61P 9/00

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **02765096 .9**

⑧⑥ Fecha de presentación: **04.10.2002**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1443946**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **11.08.2004**

⑤④ Título: **Proceso para la preparación de productos que contienen antocianina.**

③⑩ Prioridad: **09.11.2001 GB 0127031**

⑦③ Titular/es: **Medpelet Pharmaceuticals AS.**
Hansveien, 4-6
4327 Sandnes, NO

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2005

⑦② Inventor/es: **Slimestad, Rune**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2005

⑦④ Agente: **Díez de Rivera y Elizaburu, Ignacio**

DESCRIPCIÓN

Proceso para la preparación de productos que contienen antocianina.

La presente invención se refiere a un proceso para preparar un suplemento nutricional (nutracéutico) que comprende una mezcla de antocianinas.

Las antocianinas son glicósidos de sales de flavilio. Cada antocianina comprende así tres partes componentes: el núcleo hidroxilado (la aglicona); la unidad sacárida; y el contraión. Las antocianinas son pigmentos de origen natural presentes en muchas flores y frutas, y están comercialmente disponibles antocianinas individuales en forma de sales cloruro, por ejemplo, de Polyphenols Laboratories AS, Sandnes, Noruega.

Como compuestos individuales, las antocianinas se han propuesto para uso como antioxidantes (por ejemplo como sequestrantes de radicales libres) para tratamiento del sistema vascular.

Los inventores han encontrado que los efectos beneficiosos de las antocianinas individuales se potencian si, en lugar de una antocianina individual, se administra por vía oral una combinación de diferentes antocianinas, en particular una combinación que comprende tanto monosacárido-como disacárido-antocianinas. Se cree que el efecto sinérgico surge al menos en parte por las diferentes solubilidades y diferentes perfiles de captación de las diferentes antocianinas.

Sin embargo, aunque la combinación de diferentes antocianinas es clave para la presente invención, representa también un problema de producción debido a sus diferentes propiedades fisicoquímicas. Las antocianinas individuales comercialmente disponibles no se mezclan fácilmente formando un polvo fluido, tal como sería particularmente adecuado para la formación de comprimidos o el relleno de cápsulas. Los extractos normales de frutas que contienen antocianinas no pueden secarse por pulverización hasta un polvo fluido, sino que proporcionan una masa pegajosa. Los inventores han encontrado que para que el secado por pulverización tenga éxito, la solución de antocianina debe liberarse de azúcares y ácidos libres, lípidos derivados de plantas y macromoléculas, en particular lectinas.

Por tanto, vista desde un aspecto la invención proporciona un proceso para la producción de un producto que contiene antocianina, comprendiendo dicho proceso: cargar una solución acuosa de antocianina (por ejemplo un extracto líquido de planta) en una resina de intercambio catiónico; aclarar la resina con agua; aplicar un eluyente alcohol ácido a dicha resina hasta que la antocianina empieza a eluir de la misma; aplicar después de ello un eluyente alcohol no ácido a dicha resina; recoger el eluido que contiene antocianina de dicha resina; separar por evaporación el alcohol de dicho eluido; añadir agua, y si es necesario, un anticoagulante al eluyente para producir una solución acuosa de antocianina, preferiblemente una solución que contiene al menos dos antocianinas; secar por pulverización dicha solución; y opcionalmente, recubrir el producto secado por pulverización (opcionalmente después de mezclar con componentes fisiológicamente tolerables adicionales, por ejemplo vitamina C, otras antocianinas, etc., y/o después de formar comprimidos).

El producto del proceso de la invención es preferiblemente una composición ingerible por vía oral, por ejemplo un suplemento nutricional, que comprende un material secado por pulverización recubierto que comprende al menos cuatro antocianinas, siendo al menos una de ellas un monosacárido, y siendo al menos una de ellas un disacárido.

El producto contiene preferiblemente al menos tres monosacárido-antocianinas. Además, contiene preferiblemente al menos una monosacárido-antocianina en la que el sacárido es arabinosa.

El producto contiene preferiblemente al menos una disacárido-antocianina en la que el disacárido es rutinosa (concretamente, 6-ramnosilglucosa).

Además, el producto contiene preferiblemente antocianinas con al menos dos agliconas diferentes, más preferiblemente al menos cuatro.

Preferiblemente, el producto contiene especialmente antocianinas en las que las unidades de aglicona son cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina, malvidina y, opcionalmente, también pelargonidina.

En una realización preferida, el producto contiene también al menos una trisacárido-antocianina.

Los ejemplos de antocianinas adecuadas para uso en la invención incluyen: cianidin-3-O- β -glucósido, cianidin-3-O- β -galactósido, cianidin-3-O- α -arabinósido, cianidin-3-O- β -xilósido, cianidin-3-O-(6"-O- α -ramnosil- β -glucósido), cianidin-3-O-(2"-O- β -glucosil- β -galactósido), cianidin-3-O-(2"-O- β -glucosil- β -glucósido), cianidin-3-O-(2"-O- β -xilosil- β -glucósido), cianidin-3-O-(2"-O- β -xilosil- β -galactósido), cianidin-3,5-di-O- β -glucósido, cianidin-3-O- β -galactósido-5-O- β -glucósido, cianidin-3-O- α -arabinósido-5-O- β -glucósido, cianidin-3-O-(2"-O- β -xilosil- β -glucósido)-5-O- β -glucósido, cianidin-3-O-(2"-O- β -xilosil-6"-O- β -glucosil- β -galactósido), pelargonidin-3-O- β -glucósido, pelargonidin-3-O-(6"-O- α -ramnosil- β -glucósido), pelargonidin-3,5-di-O- β -glucósido, peonidin-3-O- β -glucósido, peonidin-3-O- α -arabinósido, peonidin-3,5-di-O- β -glucósido, delphinidin-3-O- β -glucósido, delphinidin-3-O-(6"-O- α -ramnosil- β -glucósido), delphinidin-3-O-(2"-O- β -xilosil- β -glucósido), petunidin-3-O- β -glucósido, malvidin-3-O- β -glucósido, malvidin-3,5-di-O- β -glucósido y malvidin-3-O- α -arabinósido-5-O- β -glucósido.

Si se desea, pueden acilarse uno o más grupos hidroxilo, especialmente en la unidad sacárido, en las antocianinas, por ejemplo portando un grupo acilo saturado o insaturado C_{1-12} , más especialmente C_{2-9} , por ejemplo un residuo ácido mono- o dicarboxílico, por ejemplo un grupo malonilo, p-cumarilo o feruloililo. Por tanto, por ejemplo, dichos compuestos acilados incluyen cianidin-3-O-(6"-O-(E-p-cumaril)-2"-O- β -xilosil- β -glucósido), cianidin-3-O-(6"-O-(E-p-cumaril)-2"-O- β -xilosil- β -glucósido)-5-O- β -glucósido; cianidin-3-O-(2"-O- β -xilosil-6"-O-(E-feruloil- β -glucosil)- β -galactósido), cianidin-3-O-(2"-O- β -xilosil-6"-O-[E-cumaril- β -glucosil]- β -galactósido) y petunidin-3-O-(6"-O-(4"-O-E-cumaril)- α -rannosil- β -glucósido)-5-O- β -glucósido.

El contraión en las antocianinas del producto de la invención puede ser cualquier contraión fisiológicamente tolerable, por ejemplo cloruro, succinato, fumarato, malato, maleato, citrato, etc. Preferiblemente, sin embargo, el contraión es un anión de fruta ácida, en particular citrato, ya que éste da como resultado productos que tienen un sabor particularmente agradable.

Son fuentes particularmente adecuadas para las antocianinas frutas tales como cerezas, mirtilos, arándanos, grosellas negras, grosellas rojas, uvas, arándanos agrios, fresas y manzanas, y verduras tales como lombarda. Los mirtilos, en particular *Vaccinium myrtillus*, y las grosellas negras, en particular *Ribes nigrum*, son especialmente adecuadas. Las bayas de *V. myrtillus* contienen cinco monosacárido-antocianinas, a saber las combinaciones agliconas:sacárido de cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina con glucosa, galactosa y arabinosa. Las grosellas de *R. nigrum* contienen cuatro antocianinas, a saber los 3-glucósidos y 3-rutinósidos de cianidina y delphinidina.

Las disacárido-antocianinas son más solubles en agua que los monosacáridos; además, las cianidin- y delphinidin-antocianinas están entre las antocianinas más solubles en agua.

Además de antocianinas, los productos del proceso de la invención pueden contener deseablemente otros ingredientes beneficiosos o inactivos, por ejemplo vitaminas (en particular vitamina C), flavonas, isoflavonas, anticoagulantes (por ejemplo maltodextrina, sílice, etc.), desecantes, etc. Sin embargo, deseablemente, las antocianinas constituyen al menos un 50% en peso de las composiciones de producto, excluyendo el material de recubrimiento.

En el proceso de la invención, el secado por pulverización se efectúa preferiblemente utilizando pulverización en una atmósfera inerte, por ejemplo, una atmósfera de nitrógeno, con temperaturas de entrada de 130 a 160°C y caudales de 5 a 12 l/h. Si el producto secado por pulverización es pegajoso, entonces aumentar el caudal y la temperatura de entrada y/o aumentar el contenido de anticoagulante y/o aumentar la velocidad de rotación del atomizador darán como resultado un producto no pegajoso. La temperatura, caudal, etc. óptimos pueden determinarse de este modo para cada fuente de antocianina separada. La solución de antocianina a secar por pulverización es deseablemente una solución acuosa que contiene antocianinas a un 5-15% en peso, más preferiblemente a un 8-12% en peso, basado en los sólidos secos.

El producto secado por pulverización está preferiblemente recubierto. Esto es importante debido a la naturaleza higroscópica de las antocianinas. El recubrimiento puede ser mediante técnicas de recubrimiento convencionales: segundo de formación de comprimidos del producto secado por pulverización; como alternativa, y preferiblemente, el recubrimiento se consigue rellenando cápsulas con el producto secado por pulverización. Aunque pueden utilizarse cápsulas de gelatina convencionales, se prefiere utilizar cápsulas de celulosa, tales como Vcap de Capsugel SA, Bélgica.

Las composiciones recubiertas contienen preferiblemente de 50 a 250 mg de antocianina por unidad de dosificación (por ejemplo cápsula), más preferiblemente de 70 a 160 mg.

La dosificación para un consumidor humano es preferiblemente de 50 a 250 mg de antocianina al día, por ejemplo una o dos cápsulas de 75 mg de antocianina al día. Esto corresponde aproximadamente al contenido de antocianina de una o dos tazas llenas de bayas frescas.

Como se ha citado anteriormente, las composiciones de producto contienen también preferiblemente vitamina C, por ejemplo de 10 a 1000, preferiblemente de 20 a 200 mg por g de antocianina.

Además de antocianinas, los productos contendrán generalmente también un anticoagulante, por ejemplo maltodextrina, lactosa o sílice, añadido a la solución de antocianina a secar por pulverización para evitar la coagulación en el proceso de secado por pulverización. Típicamente, el anticoagulante estará presente a 0,3 a 0,8 g, especialmente a 0,5 g, por gramo de antocianina.

Cuando han de incluirse antocianinas de más de una fuente de planta en los productos, se mezclan preferiblemente después del secado por pulverización. Por tanto, por ejemplo, las composiciones de producto contienen preferiblemente antocianinas de *V. myrtillus* y *R. nigrum* mezcladas después del secado por pulverización, preferiblemente en una relación en peso de 0,5:1 a 1:0,5, especialmente 1:1.

Como se ha citado anteriormente, las antocianinas individuales comercialmente disponibles y utilizadas en investigación y como componentes activos de medicamentos no se formulan fácilmente en los tipos de polvos fluidos que son particularmente adecuados para formación de comprimidos o relleno de cápsulas. Esto es inconveniente para el manejo y formulación, y el procedimiento de secado por pulverización puede utilizarse fácilmente para transformar

dichos compuestos en un polvo fluido fácilmente manejable. Esto forma un aspecto adicional de la invención.

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Extracción de antocianina

Como material bruto se utilizan las cáscaras de peladura de fruta producidas como producto de desecho del prensado de zumos de fruta a partir de *V. myrtilus* y *R. nigrum*. Los productores de zumo de fruta añaden generalmente lectinasas a la fruta antes de prensar para liberar las antocianinas en el zumo producido; sin embargo, la cáscara sigue conteniendo un alto contenido de antocianina.

Se añaden 200 l de metanol con un contenido de 0,1% en peso de HCl a 120 kg de cáscara de peladura de fruta. Se deja reposar la mezcla durante 24 horas a temperatura ambiente (20-25°C), tras de lo cual se drena el metanol. Se añaden entonces 150 l de metanol (con 0,1% de HCl) a la peladura de fruta. Se deja reposar la mezcla durante 24 horas a temperatura ambiente (20-25°C), tras de lo cual se drena el metanol. Se añaden otros 150 l de metanol (con 0,1% de HCl) a la peladura de fruta. Se deja reposar la mezcla durante 24 horas a temperatura ambiente (20-25°C), tras de lo cual se drena el metanol. Se combinan las soluciones metanólicas y se concentran hasta un 30% en una membrana de nanofiltración (por ejemplo, tal como las disponibles en Osmonic) con un límite de exclusión de 300 Da.

Si se desea, puede utilizarse etanol en lugar de metanol y puede añadirse una lectinasa al metanol para la etapa de empapado.

Se concentran adicionalmente las soluciones metanólicas concentradas a un 5% en peso de contenido de sólidos secos en un rotavapor.

Se añade agua con intercambio iónico (5 a 10 l) al concentrado para producir una solución esencialmente acuosa, que se mezcla concienzudamente después en una relación en volumen aproximadamente 1:1 con acetato de etilo. Se separan las fases y se evaporan las trazas de acetato de etilo de la fase acuosa que contiene antocianina.

Se carga después la fase acuosa en una columna de intercambio iónico (por ejemplo Amberlite XAD7), que se aclara con agua con intercambio iónico.

Se añaden después metanol y ácido cítrico al 0,25% en peso a la columna, hasta que la antocianina empieza a aparecer en el eluido, tras de lo cual se continúa la elución con metanol puro. De este modo, el eluido recogido está esencialmente libre de ácido cítrico.

Se evapora el eluido en un rotavapor hasta un contenido de sólidos secos de un 10% en peso. Se añade agua y se evapora el metanol restante hasta un contenido de sólidos secos de un 10% en peso. Se añade después maltodextrina para llevar el contenido de sólidos secos hasta un 15% en peso.

Ejemplo 2

Secado por pulverización

Se seca por pulverización la solución acuosa producida en el ejemplo 1 en un secador por pulverización farmacéutico (tipo SD-4-R-CC) de Niro A/S, Copenhague, Dinamarca, en una atmósfera de nitrógeno, utilizando un atomizador giratorio con una temperatura de entrada de 130-160°C y con un caudal de 5 a 12 l/h.

El producto es un polvo púrpura oscuro fluido que debería almacenarse en atmósfera seca.

Ejemplo 3

Cápsulas

Se mezclan los productos secados por pulverización de *V. myrtilus* y *R. nigrum* producidos en el ejemplo 2 (con un contenido de agua de menos de un 5% en peso) en una relación en peso 1:1, y se rellenan cápsulas de celulosa (Vcap) produciendo un contenido de antocianina por cápsula de 75 mg ó 150 mg.

Las cápsulas se envasan en envases blíster.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la producción de un producto que contiene antocianina, comprendiendo dicho proceso: cargar una solución acuosa de antocianina en una resina de intercambio catiónico; aclarar la resina con agua; aplicar un eluyente alcohólico ácido a dicha resina hasta que la antocianina empieza a eluir de la misma; aplicar, después de ello, un eluyente alcohólico no ácido a dicha resina; recoger el eluido que contiene antocianina de dicha resina; separar por evaporación el alcohol de dicho eluido; añadir agua, y si es necesario un anticoagulante, al eluyente para producir una solución acuosa de antocianina, preferiblemente una solución que contiene al menos dos antocianinas; secar por pulverización dicha solución; y, opcionalmente recubrir el producto secado por pulverización.

2. Un proceso según la reivindicación 1, en el que el producto secado por pulverización se mezcla con antocianinas adicionales y se recubre.

3. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha solución acuosa de antocianina contiene al menos una antocianina seleccionada de cianidin-3-O- β -glucósido, cianidin-3-O- β -galactósido, cianidin-3-O- α -arabinósido, cianidin-3-O- β -xilósido, cianidin-3-O-(6"-O- α -ramnosil- β -glucósido), cianidin-3-O-(2"-O- β -glucosil- β -galactósido), cianidin-3-O-(2"-O- β -glucosil- β -glucósido), cianidin-3-O-(2"-O- β -xilosil- β -glucósido), cianidin-3-O-(2"-O- β -xilosil- β -galactósido), cianidin-3,5-di-O- β -glucósido, cianidin-3-O- β -galactósido-5-O- β -glucósido, cianidin-3-O- α -arabinósido-5-O- β -glucósido, cianidin-3-O-(2"-O- β -xilosil- β -glucósido)-5-O- β -glucósido, cianidin-3-O-(2"-O- β -xilosil-6"-O- β -glucosil- β -galactósido), pelargonidin-3-O- β -glucósido, pelargonidin-3-O-(6"-O- α -ramnosil- β -glucósido), pelargonidin-3,5-di-O- β -glucósido, peonidin-3-O- β -glucósido, peonidin-3-O- α -arabinósido, peonidin-3,5-di-O- β -glucósido, delphinidin-3-O- β -glucósido, delphinidin-3-O-(6"-O- α -ramnosil- β -glucósido), delphinidin-3-O-(2"-O- β -xilosil- β -glucósido), petunidin-3-O- β -glucósido, malvidin-3-O- β -glucósido, malvidin-3,5-di-O- β -glucósido y malvidin-3-O- α -arabinósido-5-O- β -glucósido.

4. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha solución acuosa de antocianina contiene al menos una antocianina seleccionada de cianidin-3-O-(6"-O-(E-p-cumaril)-2"-O- β -xilosil- β -glucósido), cianidin-3-O-(6"-O-(E-p-cumaril)-2"-O- β -xilosil- β -glucósido)-5-O- β -glucósido; cianidin-3-O-(2"-O- β -xilosil-6"-O-(E-feruloyl- β -glucosil)- β -galactósido), cianidin-3-O-(2"-O- β -xilosil-6"-O-[E-cumaril- β -glucosil]- β -galactósido) y petunidin-3-O-(6"-O-(4"-O-E-cumaril)- α -ramnosil- β -glucósido)-5-O- β -glucósido.

5. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el producto secado por pulverización se recubre para producir un producto que contiene al menos cuatro antocianinas, al menos una de las cuales es un monosacárido, y al menos una de las cuales es un disacárido.

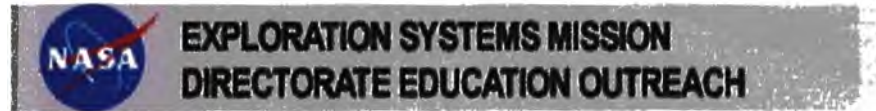
6. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha solución acuosa de antocianina es un extracto líquido de una fruta seleccionada de cerezas, mirtilos, arándanos, grosellas negras, grosellas rojas, uvas, arándanos agrios, fresas y manzanas.

7. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha solución acuosa de antocianina es un extracto líquido de la fruta de *Vaccinium myrtillus*.

8. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha solución acuosa de antocianina es un extracto líquido de la fruta de *Ribes nigrum*.

9. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el producto secado por pulverización se recubre para producir unidades de dosificación que contienen de 70 a 160 mg de antocianina por dosis.

10. Un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha solución acuosa de antocianina es un extracto líquido de antocianinas de *Vaccinium myrtillus* y *Ribes nigrum* en una relación en peso de 0,5:1 a 1:0,5.

APÉNDICE NO. 4**Growth Characteristics and Anthocyanin Content in Red Lettuce under ISS Environmental Conditions**

A space garden on long duration missions could have physiological and potential psychological benefits for the crew. Space-grown plants must thrive under higher CO₂ concentrations and lower lighting due to power and space limitations. This project looked at these effects on growth characteristics and anthocyanin content in red-romaine lettuce.

Introduction and Methods

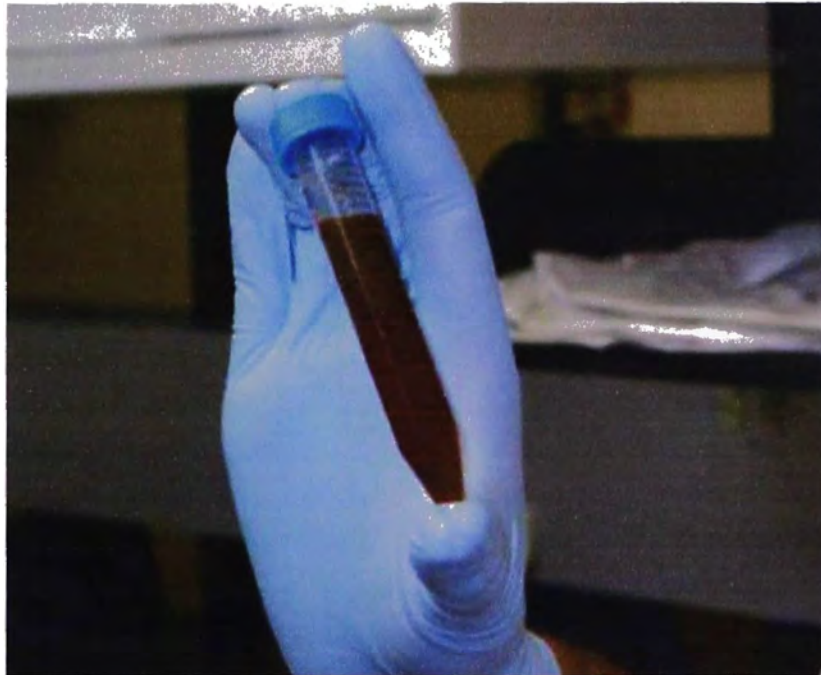
- Three cultivars of red romaine-type lettuce, Outredgeous, Eruption, and Red Sails, were grown under three different lighting intensities, 8.6, 17.2, and 26 mol m⁻² d⁻¹.
- Lettuce is a critical salad crop, but red lettuce contains anthocyanins, which create the red pigmentation and are also antioxidants, potentially combating cosmic radiation and adding more color to a space garden.
- The plants were grown hydroponically in a modified half-strength Hoagland's solution and harvested on 7, 14, 21, and 28 days after planting. At these times, fresh weight, dry weight, leaf area, and diameter was noted for an analysis of growth characteristics.
- At 28 days, the plants were also sampled for anthocyanin analysis. The red pigment was extracted from the samples using acidified methanol and then quantified from a reading at 530 nm on the spectrophotometer.



Above: The hydroponic system of Grodan® Rockwool cubes in the 2" x 2" net cups resting in Hoagland's solution

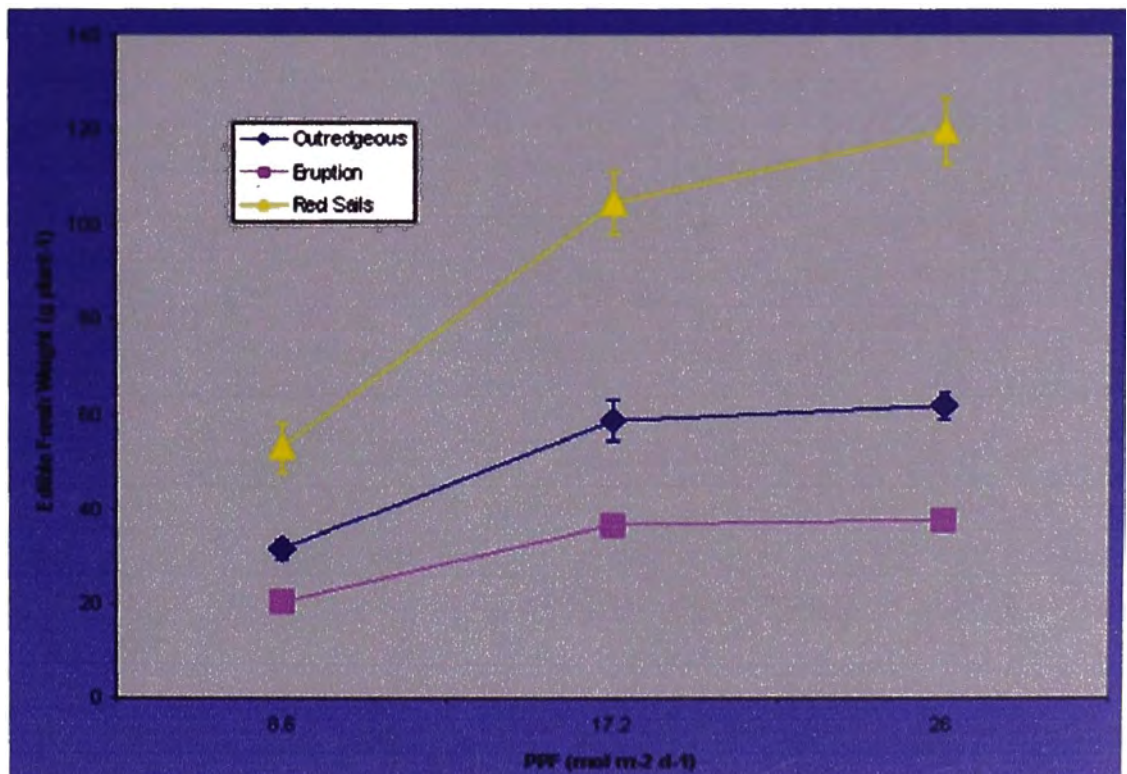


Above: Yunker harvesting 7 day old lettuce plants of the cultivar Outredgeous.

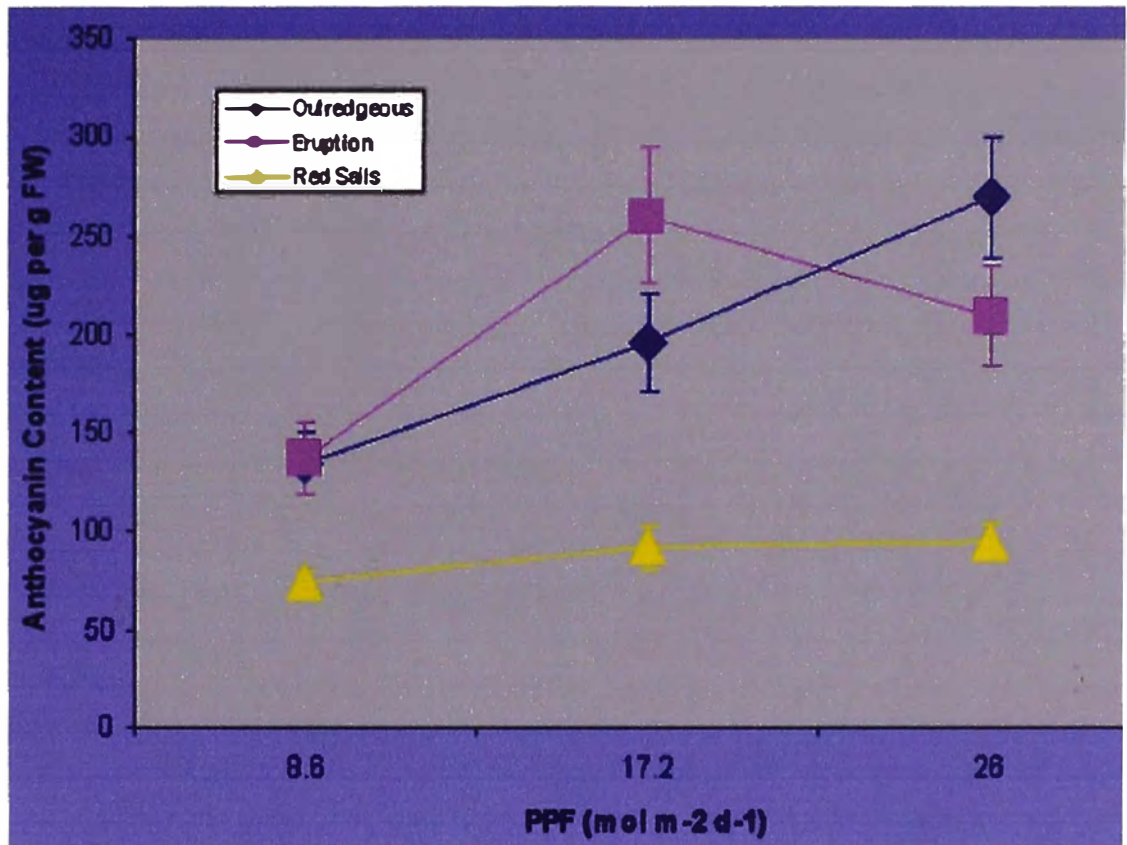


Above: Anthocyanin extraction from leaf tissue by acidified methanol. The sample was incubated overnight in the dark at 4°C.

Results



Above: Mean Edible Fresh Weight of each Cultivar at each Lighting Intensity at the 28 Day Harvest



Above: Anthocyanin Content per gram of Fresh Weight at each Lighting Intensity at the 28 Day Harvest

Red Sails, the cultivar with the highest edible fresh weight, significantly increased its growth with each increasing light level. Eruption and Outredgeous increased significantly from the lowest light level to the middle but had no difference from the middle to the highest lighting intensity.

Eruption and Outredgeous had an approximately equivalent anthocyanin content per gram of fresh weight at 8.6 PPF, with Red Sails being much lower. However, from there Outredgeous increased steadily, having more red pigment with each higher lighting level. Eruption leveled off and Red Sails increased slightly but at a three-fold lower anthocyanin level.

Acknowledgements

This research was conducted as part of the 2004 Spaceflight and Life Sciences Training Program funded by the National Aeronautics and Space Administration. The authors recognize the support of the Dynamac Corporation, the NASA Spaceflight and Life Sciences Training Program Academic Partner Alliance and the United States Department of Agriculture. Thank you to Jeff Richards, the Principal Investigator, for his support and guidance in the project. Thank you to Joyce Smolik for her help in plant care and sample analysis. Thank you to Adam Santone for his advice and criticism on all of the work. Thank you to Sharon Edney, Nate Cranston, Matt Sisko, and Hope Jones for their assistance and training.

Author: Colleen Yunker, SLSTP CBS Trainee
The Pennsylvania State University, University Park, PA

Principal Investigator: Jeff Richards, Dynamac Corporation

APÉNDICE NO. 5

Nutrition Science News

THE JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS RESEARCH AND INNOVATION

Fuente: The [December 2001](#) Issue of *Nutrition Science News*

Por Marilyn Sterling, R.D.

DIVERSOS EFECTOS A LA SALUD

Los estudios muestran las influencias positivas de las antocianinas en una variedad de condiciones de salud. Una razón es su propiedad antiinflamatoria que afecta al colágeno y el sistema nervioso. Su habilidad de proteger ambos, los vasos de sangres grandes y pequeños, del daño oxidativo derivado de un rango de efectos, incluyendo la mitigación del daño microvasal por los altos niveles de azúcar en sangre que causan las complicaciones en los diabéticos. De la misma manera, retinopatía diabética, que daña la vista, que es causada al gotear los capilares dañados.

- **La inflamación y colágeno:**

Las Antocianinas protegen de varias maneras. Primero, neutralizan enzimas que destruyen el tejido conjuntivo. Segundo, su capacidad antioxidante impide a los oxidantes dañar el tejido conjuntivo. Finalmente, reparan las proteínas dañadas en las paredes del vaso sanguíneo. Los experimentos en animales han mostrado que la suplementación con antocianinas previene eficazmente la inflamación y el daño del vaso sanguíneo subsecuente.

La habilidad antiinflamatoria de la antocianina se ha mostrado para ayudar con la amortiguación de las reacciones alérgicas. En un estudio,

investigadores Búlgaros dieron histamina y serotonina a animales, a ambos les causaron reacciones alérgicas e incrementaron la permeabilidad capilar. Los animales se suplementaron con una variedad de flavonoides. Se encontró que la antocianina tuvo el efecto antiinflamatorio más fuerte que cualquier flavonoide probado.

- **El sistema nervioso:**

Los efectos de la antocianina en la ayuda de la inflamación explican muchos de sus efectos protectores en otras partes del cuerpo. El cerebro es particularmente vulnerable al daño oxidativo. Los estudios de laboratorio muestran que la nasunina (delfinina-3-(p-cumaroilrutinosido)) protege los lípidos en el tejido del cerebro animal de la oxidación. La nitración con Peroxinitrito de residuos de tirosina en enzimas y proteínas se cree que son una causa mayor de daño cerebral en enfermedades neurodegenerativas y en trauma cerebral. El Nitrato de tirosina bloquea los lugares receptores de los nervios de factor-crecimiento, así previene nuevo crecimiento neural e inhibe la reparación. Al prevenir la nitración de la tirosina, la antocianina de la pelargonidina puede ayudar a proteger contra las enfermedades neurológicas. Se ha encontrado, en los suplementos del Blueberry incluso, como invertir los déficits neurológicos relacionados con la edad en animales.

- **Los vasos sanguíneos grandes:**

La habilidad de la antocianina como oxidante la hace combatiente de la arteriosclerosis muscular. Primero, la antocianina previene un paso importante en la arterogénesis: la oxidación de lipoproteínas de baja-densidad (LDL). El Arándano en, incluso, pequeñas cantidades protege eficazmente contra la oxidación de LDL en estudios de laboratorio. Investigadores en un estudio del Departamento De Agricultura De Los Estados Unidos (USDA) concluyeron que el arándano es un antioxidante

“más potente” que la vitamina C o Hidroxitolueno Butilado (BHT) que se usa como preservante.

Segundo, la antocianina protege la integridad de las células endoteliales que alinean las paredes del vaso sanguíneo. El daño a estas células estimula la migración de la célula sanguínea blanca al área, iniciando la arterosclerosis y la estimulación de la migración de la célula sanguínea roja. Un estudio por la USDA en la Universidad de Tufts en Boston encontró que las antocianinas de la baya del saúco se suben rápidamente dentro de las membranas celulares endoteliales dónde previenen la oxidación con peróxido de hidrógeno y otros oxidantes. Los investigadores concluyeron que la baya de saúco tiene "implicaciones importantes en... las enfermedades vasculares".

Además, las antocianinas relajan los vasos de la sangre. En un experimento, investigadores franceses trataron las aortas animales con norepinefrina, que estrecha los vasos de la sangre. La presencia de la antocianina de la delfinidina relajó la aorta al 89 por ciento, considerando que otra antocianina, la malvidina, era ineficaz. Los investigadores concluyeron que la delfinidina puede "estar involucrada en la reducción de mortalidad cardiovascular relacionada a la presencia de vino, frutas, y verduras en la dieta."

● **Los vasos sanguíneos pequeños:**

Las Antocianinas ayudan a mantener la integridad de microcapilaridad estabilizando las paredes capilares. Se llama Isquemia-Reperfusión al bloqueo o reducción de oxígeno seguido por su restablecimiento. Isquemia-Reperfusión crea oxidantes que producen la adherencia de la célula sanguínea blanca a las paredes microcapilares, aumenta la permeabilidad de la pared capilar, reduce el flujo de sangre, y a menudo las causas del daño capilar permanente.

Se dirigió uno de los experimentos clásicos en antocianinas en las marmotas de Italia. Isquemia-reperusión se creó en sus mejillas por un breve sujetado, causando que las células blancas se agrupen hacia la pared capilar y dañarla. Después de varias semanas de suplementación con arándano, científicos repitieron las pruebas. Este tiempo, el suministro de sangre normal a través de los capilares se restauró, las células sanguíneas menos blancas se pegaron a las paredes del vaso, y la permeabilidad estaba significativamente reducida después de la reperusión.

● **La diabetes:**

Los daños microvasales por el alto nivel de azúcar en la sangre causa la mayoría de las complicaciones en la diabetes. Se unen las proteínas de colágeno con los azúcares, produciendo un colágeno de vaso sanguíneo polimérico anormal. En un estudio alemán, 12 diabéticos adultos tomaron 600 mg de antocianina diariamente durante dos meses. Las muestras de su tejido de la encía se tomaron antes y después del tratamiento. Después de la suplementación, la producción de colágeno anormal estaba significativamente decrecida. La Diabetes da a los capilares más permeabilidad a las moléculas grandes que la que deberían tener. Por ejemplo, la albúmina emigra en el espacio entre las células y no se sube adecuadamente por el sistema linfático.

En un reciente estudio francés, investigadores usando a un modelo diabético animal encontraron que aquéllos tratados con arándano mantuvieron la función microcirculatoria normal incluyendo normal filtración capilaria de albúmina y su captación por el sistema linfático.

Una de las complicaciones del diabético más serias es la retinopatía que puede causar ceguera. Retinopatía ocurre cuando el cuerpo intenta reparar por goteo, los capilares dañados, pero así sobreproduce proteínas

anormales. No sólo las antocianinas impiden a los capilares gotear en primer lugar, sino ellos también previenen la proliferación de la proteína anormal. En un estudio italiano, 30 de 40 personas con retinopatía mostraron mejora significativa después de tomar 120 mg de antocianina diariamente durante varias semanas.

- **La vista:**

Las Antocianinas también pueden mejorar la vista por otros mecanismos. En un estudio francés realizado en 1964, investigadores en una prueba de visión para 36 personas sobre su habilidad de adaptarse a la luz y oscuridad, antes y después de tomar antocianinas del Bilberry (arándano). Durante varias horas después de la suplementación, su vista mejoró significativamente, aunque el efecto se desgastó después de 24 horas. Un reciente estudio japonés encontró que las personas que tomaron 50 mg de las antocianinas de la pasa negra de Corinto se adaptaron mejor a la oscuridad y tenían menos fatiga del ojo que aquéllos en el grupo que usaron el placebo.

- **Otros efectos.**

Las Antocianinas pueden tener otros beneficios potenciales para los humanos. En laboratorio, han descubierto como inhibir algunas células de tumor humanos. La Cianidina y Delfinidina inhiben el factor de crecimiento epidérmico receptor en las células de cáncer, mientras la malvidina es menos eficaz.

El Bilberry, tradicionalmente usado para las úlceras, puede aumentar la producción de mucosidad del estómago y puede proteger al estómago de una lesión. En un estudio italiano desenfrenado, 10 hombres tomaron 1,200mg de antocianinas durante 10 días. Esto aumentó su secreción de jugo gástrica y mucosidad, mientras en el estómago la producción ácida permanecía constante.

Un reciente estudio piloto austríaco, junto con la Fuerza aérea americana, encontró una propiedad, estandarizada, que el extracto de la baya de saúco redujo los parámetros relacionados con la tensión tales como los niveles de glucosa en sangre inducidos por la tensión.

Las Antocianinas han recibido menos atención que otros flavonoides, a pesar de sus efectos de largo alcance. Puesto que las bayas eran una gran parte de dietas tempranas, nuestros antepasados comieron mucho más antocianina probablemente que nosotros. Algunos investigadores sienten que, por la comparación, nosotros somos deficientes en antocianina. Cuando las personas se den cuenta del poder antioxidante de estos compuestos, quizás nosotros podamos remediar esa deficiencia. En el proceso, algunas de nuestras comidas populares pueden ponerse más agradables aún.