

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
Escuela profesional de Química
Facultad de Ciencias



**LAS ANTOCIANINAS Y SUS APLICACIONES
COMO COLORANTES NATURALES DE
ALIMENTOS Y BEBIDAS**

INFORME DE SUFICIENCIA

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN QUÍMICA
JORGE LUIS BREÑA ORÉ**

LIMA-PERÚ

2002

RESUMEN

En el presente trabajo se reporta un estudio bibliográfico sobre las antocianinas y sus aplicaciones como colorantes de alimentos y bebidas. Las *antocianinas* como pigmentos naturales inocuos tienen considerable potencial en la industria alimentaria, pero a diferencia de los pigmentos rojos sintéticos que se utilizan actualmente, las antocianinas no son estables especialmente en soluciones neutras y alcalinas, ocurriendo fácilmente cambios durante el procesamiento y almacenaje del material crudo, los que se manifiestan por una pérdida del color, oscurecimiento del producto y formación de precipitados en los extractos. En el estudio preliminar se desarrollan los conceptos generales de las antocianidinas y antocianinas, diferencias, distribución natural y la teoría del color. En los siguientes capítulos se desarrolla la química de estos pigmentos lo que nos permitirá comprender el rol fundamental de ciertas sustancias llamadas copigmentos en la estabilidad de las mismas, previendo un futuro alentador para incrementar el uso de estos colorantes.

Asimismo el presente trabajo contiene un resumen de las técnicas de extracción, purificación, evaluación cuantitativa del contenido de antocianinas e identificación por métodos convencionales tales como la cromatografía de papel, reactivos de desplazamiento batocrómico y las técnicas espectroscópicas tales como UV-Visible, FAB-MS, RMN-¹H, IR.

Finalmente, se hace referencia a los estudios que han demostrado que las antocianinas, contenidas en la uva son compuestos vasoactivos con probada actividad antioxidante y antielastasa. y que los antocianos del malz morado evita la aparición de cáncer en el intestino grueso.

SUMMARY

In this paper is reported a bibliographical study on the anthocyanins and its applications like coloring of foods and drinks. The anthocyanins like innocuous natural pigments have considerable potential in the alimentary industry, but contrary to the synthetic red pigments that are used at the moment, the anthocyanins is not stable especially in neuter and alkaline solutions, happening changes easily during the prosecution and storage of the raw material, those that are manifested by a loss of the color, dimness of the product and formation of having precipitated in the extracts. In the preliminary study it is developed the general concepts of the anthocyanidins and anthocyanins, differences, natural distribution and the theory of the color. In the following chapters, the chemistry of these pigments is developed and will allow us to understand the fundamental list of certain substances called copigments in the stability of the same ones, foreseeing an encouraging future to increase the use of these colorings.

Also the present work contains a summary of the extraction techniques, purification, quantitative evaluation of the anthocyanins content and identification for such conventional methods as the paper chromatography, reagents of bathochromic displacement and the technical such UV-visible spectroscopy, FAB-MS, RMN-¹H.

Finally, reference is made to the studies that have demonstrated that the anthocyanins contained in the grape is vasoactives compounds with proven antioxidant activity and that the anthocyanins of the Purple corn avoids the cancer appearance in the thick intestine.

**... A mi madre, quién realizó
el milagro de culminar esta
etapa de mi vida ...**

**. . . A mis hijos y esposa, quienes soportaron
el infierno de verlo culminar . . .**

Mi especial agradecimiento a Enrique Neira y Helda del Castillo, mis amigos, cual fuerza impelente, me permitieron culminar el presente trabajo.

A Virginia Torpoco Carmen por su valiosa asesoría y por haber brindado su experiencia como investigadora en el área de los productos naturales.

Una mención especial a Olga Lock de Ugaz cuya autoría intelectual,orgullo para nuestro país, ha sido fuente de mi inspiración.

RESUMEN

En el presente trabajo se reporta un estudio bibliográfico sobre las antocianinas y sus aplicaciones como colorantes de alimentos y bebidas. Las *antocianinas* como pigmentos naturales inocuos tienen considerable potencial en la industria alimentaria, pero a diferencia de los pigmentos rojos sintéticos que se utilizan actualmente, las antocianinas no son estables especialmente en soluciones neutras y alcalinas, ocurriendo fácilmente cambios durante el procesamiento y almacenaje del material crudo, los que se manifiestan por una pérdida del color, oscurecimiento del producto y formación de precipitados en los extractos. En el estudio preliminar se desarrollan los conceptos generales de las antocianidinas y antocianinas, diferencias, distribución natural y la teoría del color. En los siguientes capítulos se desarrolla la química de estos pigmentos lo que nos permitirá comprender el rol fundamental de ciertas sustancias llamadas copigmentos en la estabilidad de las mismas, previendo un futuro alentador para incrementar el uso de estos colorantes.

Asimismo el presente trabajo contiene un resumen de las técnicas de extracción, purificación, evaluación cuantitativa del contenido de antocianinas e identificación por métodos convencionales tales como la cromatografía de papel, reactivos de desplazamiento batocrómico y las técnicas espectroscópicas tales como UV-Visible, FAB-MS, RMN-¹H, IR.

Finalmente, se hace referencia a los estudios que han demostrado que las antocianinas, contenidas en la uva son compuestos vasoactivos con probada actividad antioxidante y antielastasa. y que que los antocianos del maíz morado evita la aparición de cáncer en el intestino grueso.

SUMMARY

In this paper is reported a bibliographical study on the anthocyanins and its applications like coloring of foods and drinks. The anthocyanins like innocuous natural pigments have considerable potential in the alimentary industry, but contrary to the synthetic red pigments that are used at the moment, the anthocyanins is not stable especially in neuter and alkaline solutions, happening changes easily during the prosecution and storage of the raw material, these are manifested by a loss of the color, dimness of the product and formation of precipitates in the extracts. In the preliminary study it is developed the general concepts of the anthocyanidins and anthocyanins, differences, natural distribution and the theory of color. In the following chapters, the chemistry of these pigments is developed and will allow us to understand the fundamental list of certain substances called copigments in the stability of the same ones, foreseeing an encouraging future to increase the use of these colorings.

Also the present work contains a summary of the extraction techniques, purification, quantitative evaluation of the anthocyanins content and identification for such conventional methods as the paper chromatography, reagents of bathochromic displacement and the technical such UV-visible spectroscopy, FAB-MS, RMN-¹H.

Finally, reference is made to the studies that have demonstrated that the anthocyanins contained in the grape are vasoactives compounds with proven antioxidant activity and that the anthocyanins of the Purple corn avoids the cancer appearance in the thick intestine.

LAS ANTOCIANINAS Y SUS APLICACIONES COMO COLORANTES EN ALIMENTOS Y BEBIDAS

CONTENIDO RESUMIDO

	Página
Resumen	V
Summary	VI
Palabras claves	XI
Índice de figuras	XII
Índice de tablas	XVI
 INTRODUCCIÓN	 1
 I ASPECTOS GENERALES	 3
A.- COLORANTES	3
1.- Aditivos de color	3
2.- Colorantes naturales	4
3.- Evaluación de la toxicidad	6
B.- ANTOCIANIDINAS Y ANTOCIANINAS	8
1.- Antocianidinas	8
2.- Antocianinas	11
C.- COLOR Y ESTRUCTURA	15
1.- Teoría del color	15
2.- Estructura y pH	18
3.- Antocianinas-color y estructura	21
 II ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO	 27
A.- BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES	27
1.- Introducción	27
2.- Formación del esqueleto-base $C_6-C_3-C_6$	28
a) Fenilalanina amonio liasa (PÁL)	30
b) Ácido cinámico 4-hidroxilasa (CAH)	31
3.- Biosíntesis de flavonoides	32
4.- Biosíntesis de Antocianidinas	35
5.- Biosíntesis de Antocianinas-glicosidación	37
B.- SÍNTESIS QUÍMICA DE ANTOCIANIDINAS Y ANTOCIANINAS	39
1.- Introducción	39

2.- Síntesis total de antocianidinas y antocianinas	40
a) Reacción de Bulow y Wagner	40
b) Reacción de Malkin y Robinson	42
c) Reacción de Johnson y Melhuis	43
d) Reacción de Sweeny y Iacobucci	43
e) Reacción de Willstätter y Zechmeister	44
f) Reacción de Pratt y Robinson	45
g) Reacción de Robertson y Robinson	46
h) Reacción de Levy, Posternack y Robinson	47
3.- Síntesis de antocianidinas y antocianinas por conversión química de precursores flavonoides	48
a) Reacción de Jurd	48
b) Reacción de Clark-Lewis y Jemison	49
c) Reacción de Sweeny y Iacobucci	50
d) Reacción de Sweeny y Iacobucci	52
e) Reacción de Bauer	53
f) Reacción de Walkihira	54
g) Reacción Robertson y Robinson	54
4.- Síntesis de sales de flavilio relacionados con las antocianidinas	55
a) Reacción de Bulow	55
b) Reacción de Johnson y Melhuis	55
c) Reacción de Perkin y Robinson	56
d) Reacción de Goswami y Chakravarti	57
e) Reacción de Mercier	57
f) Ciclación Oxidativa de la chalcona y 2,4,4'-trimetoxichalcona a sales de flavilio	58
 C.- QUÍMICA DE LAS ANTOCIANINAS	 60
1.- Química de las soluciones acuosas	60
a) Efecto de los cambios de pH	60
b) Efecto de la estructura sobre la estabilidad del color de las antocianinas	62
c) Reacciones de oxidación	66
<u>i</u> Reacciones con ácido ascórbico/O ₂	66
<u>ii</u> Reacciones con peróxido de hidrógeno	68
<u>iii</u> Otras reacciones de oxidación	70
d) Reacciones de reducción	71
e) Reacciones con nucleófilos	73
<u>i</u> Reacción con bisulfito de sodio	73
<u>ii</u> Reacción con otros nucleófilos	73
f) Reacciones con electrófilos	74

2.- Copigmentación	75
a) Efecto del pH y del ácido clorogénico en el espectro de absorción de la malvina	78
b) Efecto de la temperatura sobre el espectro visible de la Malvina con y sin ácido clorogénico	79
c) Copigmentación por auto-asociación	82
d) Copigmentación intramolecular	83
e) Copigmentación por formación de complejos con flavonoides	85
 D.-EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN	 88
1.- Extracción	88
a) Introducción	88
b) Evaluación del proceso de extracción	88
2.- Purificación	89
a) Precipitación con acetato de plomo	90
b) Cromatografía de Columna con polimamida	92
c) Cromatografía de intercambio iónico	93
 E.- MÉTODOS CUANTITATIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS	 94
1.- Determinación de antocianinas totales	94
a) Introducción	94
b) Establecimiento de coeficientes de extinción	97
c) Discusión de resultados	98
<u>I</u> Mediciones de absorbancia	98
<u>II</u> Coeficientes de extinción	98
<u>III</u> Cálculo del contenido de antocianinas totales	99
<u>IV</u> Métodos de evaluación de antocianinas totales	102
2.- Deteminación del índice de degradación	102
 F.- IDENTIFICACIÓN DE ANTOCIANIDINAS Y ANTOCIANINAS	 103
1.- Identificación por cromatografía de papel	103
2.- Espectroscopia Ultravioleta-Visible	107
a) Introducción	107
b) Identificación de antocianinas y antocianidinas por desplazamientos batocrómicos	107
3.-Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear	109

4.-Espectrometría de Masa	113
5.-Espectroscopia Infrarroja - IR	114
6.-Aplicación de las técnicas espectroscópicas a la identificación de antocininas del <i>Ranunculus asiaticus</i>	115
G.-IMPORTANCIA DE LAS ANTOCIANINAS Y SUS APLICACIONES	121
1.- Antocianinas de las uvas (piel o cáscara)	121
a) Aspectos generales	121
b) Formas de presentación y aplicaciones	122
c) Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza	124
d) Propiedades antioxidantes del vino y sus componentes	126
i Introducción	126
ii Capacidad antioxidante del vino	128
2.- Maíz morado y antocianinas	130
a) Aspectos generales	130
b) La materia colorante	131
III CONCLUSIONES	134
IV BIBLIOGRAFÍA	137
V ANEXOS	144
Anexo N°1. Aditivos colorantes sintéticos para alimentos certificados por la FDA.	144
Anexo N°2. Colorantes exentos de certificación aprobados por la FDA.	145
Anexo N°3. Descripción de los colorantes de mayor aplicación.	146
Anexo N°4. Ocurrencia natural de antocianidinas.	154
Anexo N°5. Algunos ejemplos de antocianinas y su ocurrencia natural.	155
Anexo N°6. Plantas que contienen partes pigmentadas.	157
Anexo N°7. Cambios de color de la cianidina en función del pH.	160
Anexo N°8. Estructura general de los flavonoides y sus derivados.	161
Anexo N°9. Interconversiones de la cianidina en función del pH.	162
Anexo N°10. Efectos de la estructura sobre la vida media (τ) de los flavilios coloreados.	163
Anexo N°11. Copigmentación de la cianidina-3,5-diglicósido a pH (3,32).	165
Anexo N°12. Artículo de Caretas Ed. 1685 (29-08-01).	166

PALABRAS CLAVES

A	:	Base quinoidal
ABTS	:	ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AcOH	:	Ácido acético
Acy	:	Antocianina
Acy T	:	Antocianinas totales
AH*	:	Catión flavilio
B	:	Pseudo-base cromenol
BAW	:	n-butanol-ácido acético glacial- agua : Fase superior
Bu:HCl	:	n-butanol-HCl conc.
C	:	Chalcona
CAH	:	Ácido cinámico 4-hidroxilasa
CCAH	:	Comité científico para la alimentación humana de la Unión Europea
Chloroanil	:	tetracloro- <i>p</i> -benzoquinona
CoA	:	Coenzima-A
COSY- ¹ H- ¹ H	:	Correlated Spectroscopy - ¹ H - ¹ H
Cr	:	Cranberry , arándalo
Cy	:	Cianidina
D.O.	:	Densidad óptica
Dp	:	Delfinidina
EROs	:	Especies reactivas del oxígeno
FAB-MS	:	Espectrometría de masa (Fast-Atom Bombardement)
FAO	:	Food and Agriculture Organizaton of de United Nations
FD&C	:	Food and Drug Compound
FDA	:	Food and Drug Admistration
Forestal	:	Ácido acético glacial-HCl conc.
Fórmico	:	Ácido fórmico-HCl conc.
Gl	:	glucosa
IDA	:	Ingesta diaria admisible
IR	:	Espectroscopia infrarrojo
JECFA	:	Join Expert Committee on Food Additives
MAW	:	Metanol-ácido acético- agua
Mv	:	Malvidina
NOE	:	Nuclear Overhauser Effect
NOEL	:	NO effect level
PAL	:	Fenilamonio liasa
Pg	:	Pelargonidina
Pn	:	Peonidina
Pt	:	Petunidina
T.O.D.	:	Densidad óptica total
TAA	:	Actividad antioxidante total de los vinos
TAR	:	Reactividad antioxidante total
TRAP	:	Potencial antioxidante total

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura N° 1.1	Estructura de la Cianidina	5
Figura N° 1.2	Estructura del núcleo-base de las antocianidinas	8
Figura N° 1.3	Antocianidinas de mayor abundancia natural	9
Figura N° 1.4	Numeración del núcleo-base, de las antocianidinas	10
Figura N° 1.5	Biósidos de mayor frecuencia en la formación de antocianinas	11
Figura N° 1.6	Ejemplo de la nomenclatura de las antocianinas	12
Figura N° 1.7	Ejemplos de algunos cromóforos	16
Figura N° 1.8	Ejemplo de algunos auxocromos	17
Figura N° 1.9	Colorantes formado por la unión de un cromóforo y un auxocromo	17
Figura N° 1.10	Estructura de los pigmentos de las rosas rojas y del aciano	18
Figura N° 1.11	Reacciones ácido-base de las sales de flavilio	19
Figura N° 1.12	Reacción ácido-base y mesomería de las antocianidinas relacionadas con el color	20
Figura N° 1.13	Espectro de absorción de: (a) (+)-catequina y (b) catecol en etanol	22
Figura N° 1.14	Espectro UV-Visible de: (a) naringenina y (b) 2,4-dihidroxiacetofenona en etanol	22
Figura N° 1.15	Espectro de absorción de (a) apigenina y (b) quercetina en etanol	23
Figura N° 1.16	Espectro de absorción de: (a) pelargonidina - 3 - glucósido, (b) pelargonidina-3,5-diglucósido y (c) pelargonidina-3- <i>p</i> -coumarilglucósido-5-glucósido en 0,01 % de HCl metanólico.	24
Figura N° 2.1	Probable origen del esqueleto $C_6-C_3-C_6$ de los compuestos flavonoides.	28
Figura N° 2.2	Posibles rutas para el ácido <i>p</i> -coumárico	29
Figura N° 2.3	Estructura de los cloroflavonoides (I) y de las flavoninas (II)	30
Figura N° 2.4	Desaminación de la L-fenilalanina	31
Figura N° 2.5	Hidroxilación del ácido cinámico	31

Figura N° 2.6	Mecanismo propuesto para la formación de fenoles por catálisis con mono-oxigenasa	32
Figura N° 2.7	Incorporación de chalconas en otros compuestos flavonoides	34
Figura N° 2.8	Rutas hipotéticas no redox para las antocianidinas	35
Figura N° 2.9	Resumen de la biosíntesis de las antocianidinas	36
Figura N° 2.10	Etapas enzimáticas en la formación de flavonas biósidas aciladas	38
Figura N° 2.11	Secuencia enzimática para la formación de flavonol-3,7-diglucósido	39
Figura N° 2.12	Reacción de Bulow-Wagner para la síntesis de antocianidinas	41
Figura N° 2.13	Reacción de Malkin-Robinson para la síntesis de antocianidinas	42
Figura N° 2.14	Reacción de Johnson y Melhuish para la síntesis de antocianidinas	43
Figura N° 2.15	Reacción de Sweeny-Iacobucci para la síntesis de antocianidinas	43
Figura N° 2.16	Reacción de Willstätter y Zechmeister para la síntesis de antocianidinas	44
Figura N° 2.17	Reacción de Pratt y Robinson para la síntesis de antocianidinas	45
Figura N° 2.18	Reacción de Robertson y Robinson para la síntesis de antocianinas	46
Figura N° 2.19	Reacción de Levi, Posternack y Robinson para la síntesis antocianidinas	47
Figura N° 2.20	Reacción de Jurd para la síntesis de antocianidinas	49
Figura N° 2.21	Reacción de Clark-Lewis y Jemison para la síntesis antocianidinas	50
Figura N° 2.22	Reacción de Sweeny y Iacobucci para la síntesis de antocianidina	51
Figura N° 2.23	Reacción de Sweeny y Iacobucci para la síntesis de antocianidinas	52
Figura N° 2.24	Reacción de Bauer para la síntesis de antocianidinas	53
Figura N° 2.25	Reacción de Walkihira para la síntesis de antocianidinas	54

Figura N° 2.26	Reacción de Robertson y Robinson para la síntesis antocianidinas	54
Figura N° 2.27	Reacción de Bulow para la síntesis de antocianidinas	55
Figura N° 2.28	Reacción de Johnson y Melhuis para la síntesis de antocianidinas	56
Figura N° 2.29	Reacción de Perkin y Robinson para la síntesis de antocianidinas	56
Figura N° 2.30	Reacción de Goswami y Chakravarti para la síntesis de antocianidinas partiendo de coumarinas	57
Figura N° 2.31	Reacción de Mercier para la síntesis de antocianidinas partiendo de derivados de la coumarina	58
Figura N° 2.32	Síntesis de antocianidinas por ciclación oxidativa de la chalcona	59
Figura N° 2.33	Equilibrios ácido - base en función del pH. AH ⁺ : cationes flavilios, A: forma quinoidal, B: cromenol y C: chalcona	61
Figura N° 2.34	Equilibrio de distribución para AH ⁺ , A, B, y C para el malvidin-3glucósido en función del pH	61
Figura N° 2.35	Equilibrio de distribución de las formas: AH ⁺ , A, B y C para el cloruro de 4', 7- dihidroxiflavilio en función de pH.	63
Figura N° 2.36	Equilibrio de distribución para las formas AH ⁺ , A, B y C del cloruro de 4'-metoxi-7-hidroxiflavilio como función del pH	64
Figura N° 2.37	Equilibrio de distribución para las formas AH ⁺ , A, B y C del cloruro de apigenidina como función del pH	65
Figura N° 2.38	Decoloración del cloruro de apigenidina por ácido ascórbico y derivados	67
Figura N° 2.39	Reacción de las antocianinas con el H ₂ O ₂	68
Figura N° 2.40	Curso de las reacciones de oxidación con H ₂ O ₂	69
Figura N° 2.41	Reacción de oxidación de sales de flavilio no sustituidas en la posición 3	70
Figura N° 2.42	Reacción de oxidación con ácido perftálico	70

Figura N° 2.43	Hidrogenación catalítica de antocianinas	71
Figura N° 2.44	Reducción con cinc metálico de antocianinas	71
Figura N° 2.45	Reducción de antocianinas con hidruro metálico	72
Figura N° 2.46	Reacción del 2-flaveno con el fenol	74
Figura N° 2.47	Estructura de la malvina y el ácido clorogénico	76
Figura N° 2.48	Transformaciones de la malvina en función del pH	77
Figura N° 2.49	Espectro visible de la malvina ($7,73 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) y ácido clorogénico iónica ajustada a 0,2M.	79
Figura N° 2.50	Parte superior: Espectro visible de la malvina sin ácido clorogénico a diferentes temperaturas Parte inferior: Espectro visible de la malvina con ácido clorogénico a diferentes temperaturas	80
Figura N° 2.51	Influencia de la temperatura sobre el máximo de absorción de la malvina con ácido clorogénico, a diferentes razones molares	81
Figura N° 2.52	Esquema representativo de tres tipos de copigmentación	82
Figura N° 2.53	Estructura química de la antocianina extraída de la Zebrina pendula	84
Figura N° 2.54	Representación del complejo molecular entre la apigenidina y el ácido 5'- sulfónicoquercetina	85
Figura N° 2.55	Representación general del espectro de absorción de los flavonoides	107
Figura N° 2.56	Espectro Infrarrojo (a) y ultravioleta (b) de las antocianinas de la col morada	115
Figura N° 2.57	Antocianinas del <i>Ranunculus asiaticus</i>	119
Figura N° 2.58	(a) Uvas y su extracto(<u>23</u>). (b)Espectro UV - visible del extracto de cáscaras de uva.	123
Figura N° 2.59	Uvas y vino tinto de crianza	125
Figura N° 2.60	(a) Chicha morada. (b) Maíz morado y su extracto	132
Figura N° 2.61	Espectro IR y UV-Visible de las antocianinas del maíz morado	133

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla N° 2.1	Valores de vida media para la descomposición por efecto de la luz soluciones de Acy y soluciones de antocianinas adicionadas de ácido tánico a pH = 2, 3, 4	86
Tabla N°2.2	Valores de vida media para la descomposición de las fracciones purificadas a diferentes pH	87
Tabla N° 2.3	Recuperación de antocianinas totales del arándalo extracción con EtOH - HCl 1,5N	89
Tabla N° 2.4	Coefficientes de extinción molar de antocianidinas y antocianinas	96
Tabla N° 2.5	Coefficientes de extinción de las antocianinas del arándalo en medio alcohólico	99
Tabla N° 2.6.-	Propiedades de las antocianidinas comunes	105
Tabla N° 2.7	Propiedades de las antocianinas comunes	106
Tabla N° 2.8	Valor de absorción para las banda I y II de los diferentes tipos de flavonoides	108
Tabla N° 2.9	Valores espectroscópicos para algunas antocianinas aciladas	110
Tabla N° 2.10	Propiedades cromatográficas y espectrales de las antocianinas del <i>Ranunculus asiaticus</i>	117
Tabla N° 2.11	Datos de RMN- ¹ H para las antocianinas de las flores de <i>Ranunculus asiaticus</i>	118

INTRODUCCIÓN

Los colorantes para alimentos han sido tema de controversia casi desde que se introdujeron por primera vez al mercado debido a su mala reputación de ser potencialmente tóxicos. Pueden utilizarse para engañar al consumidor, y su principal función es mejorar la apariencia, en vez del valor nutritivo o seguridad. A excepción de la rivotravina, β -caroteno y el apocarotenal, los colorantes no tienen ningún valor nutricional.

Son infinitas las plantas que producen colorantes, pero a pesar de su universalidad, no están suficientemente concentrados para permitir una rápida y económica extracción, son más costosos y menos estables que los colorantes sintéticos FD&C. Así al escoger una planta como posible fuente de colorantes debe tomarse en cuenta: *lo económico, lo técnico y lo legal*. El material debe estar disponible en cantidad suficiente a precio razonable, el proceso de obtención del colorante debe ser sencillo y barato y el producto final debe cubrir las exigencias del mercado, así como los requerimientos de tipo legal.

Las *antocianinas* como pigmentos naturales inocuos tienen considerable potencial en la industria alimentaria, pero a diferencia de los pigmentos rojos sintéticos que se utilizan actualmente, las antocianinas no son estables especialmente en soluciones neutras y alcalinas, ocurriendo fácilmente cambios durante el procesamiento del material crudo y el almacenaje, los que se manifiestan por una pérdida del color, oscurecimiento del producto y formación de precipitados en los extractos. Sin embargo, la presencia de ciertas sustancias llamadas copigmentos asumen una importancia fundamental en el estudio de la estabilidad de las antocianinas, previendo un futuro alentador para incrementar el uso de estos colorantes.

Diversos estudios han demostrado que las antocianinas, por ejemplo, contenidas en la uva son compuestos vasoactivos con probada actividad antioxidante y antielastasa. En ese sentido se demostró que posee propiedades captadoras de radicales libres superóxido e

hidroxilo e inhibidoras de la peroxidación lipídica de igual manera que lo hacen los antocianósidos de *Vaccinium Myrtillus*, siendo más activas como antioxidantes que la vitamina E (1000 veces más), vitamina C (575 % más eficaz) y que el β -caroteno(575 % más eficaz). Adicionalmente, los estudios del Profesor Tomoyuki Shirai de la Universidad de Nagoya, Japón ha establecido que los antocianos del maíz morado evita la aparición de cáncer en el intestino grueso. El estudio no puede ser más promisorio para la sostenida batalla contra el cáncer, sino también por su impacto en la economía nacional. El Perú es el único país con sembríos comerciales de maíz morado y nos ubica en inmejorables condiciones para potenciar y generar el correspondiente valor agregado para estos productos.

A pesar de la importancia económica y el "boom" actual en la revalorización de lo natural, la industria de los colorantes no alcanza aún en nuestro país el desarrollo que se espera por ser poseedores de una biodiversidad inigualable. Consciente de esta problemática, se desarrolla el presente trabajo de investigación sobre los colorantes naturales y, específicamente sobre las antocianinas, ya que, en nuestra flora existen diversas plantas que contienen este tipo de pigmentos: *hierba santa, sauco, maíz morado, uva, etc.*

CAPÍTULO I

ASPECTOS GENERALES

A.- COLORANTES

1.- Aditivo de color

Un aditivo de color es cualquier tinte, pigmento, sustancia natural o artificial que adicionado a los alimentos pueda impartir color. Los aditivos de colores se usan en alimentos por muchas razones, inclusive para compensar la pérdida de los colores, causada por el almacenamiento, procesamiento químico o para corregir las variaciones naturales del color de algunos alimentos.

Los colores permitidos para el uso en los alimentos se clasifican como certificados y exentos de certificación. *Los colores certificados* son compuestos orgánicos sintéticos y varios de ellos del tipo **azoico**. Los fabricantes deben enviar una muestra de cada lote de producción a la Food and Drug Administration (**FDA**), para su certificación (1). En los Estados Unidos existen nueve colores certificados y aprobados para el uso en alimentos (Anexo N° 1). Un ejemplo es el Food and Drug Compound, FD&C Amarillo N° 6, usado en cereales, panes, bizcochos, meriendas y otros alimentos. Los aditivos de colores *exentos de certificación*, incluyen los pigmentos derivados de fuentes naturales tales como vegetales, minerales o animales. Por ejemplo, el color caramelo producido comercialmente, se obtiene calentando el azúcar y otros carbohidratos, bajo condiciones estrictamente controladas,

para usarlo en salsas, bebidas sin alcohol, pastelería y muchos otros alimentos. La mayor parte de los colores exentos de certificación, también deben cumplir con ciertas normas legales de discernimiento de especificaciones y pureza.

2.- Colorantes naturales

La distinción entre natural y artificial, términos muy utilizados en las polémicas sobre la salubridad de los alimentos, es de difícil aplicación cuando se quiere hablar con propiedad de los colorantes alimentarios. En sentido estricto, solo sería *natural* el color que un alimento tiene por sí mismo. Esto puede generalizarse a los colorantes presentes de forma espontánea en otros alimentos y extraíbles de ellos, pero puede hacer confusa la situación de aquellas sustancias totalmente idénticas pero obtenidas por síntesis química. También la de colorantes obtenidos de materiales biológicos no alimentarios, insectos, por ejemplo, y la de aquellos que pueden bien añadirse o bien formarse espontáneamente al calentar un alimento, como es el caso del caramelo. Los colorantes naturales son considerados en general como inocuos y consecuentemente las limitaciones específicas en su utilización son menores que las que afectan a los colorantes artificiales.

La mayoría de los 26 colorantes aprobados y *exentos de certificación* se extraen de fuentes naturales, casi siempre plantas. Los atractivos colores de las frutas y verduras se deben a la presencia de compuestos que se encuentran en los tejidos de las plantas y que absorben luz a ciertas λ . Estos pigmentos constituyen un grupo de compuestos con estructura diversa, cuya presencia y concentraciones relativas varían según la especie, el grado de madurez y las condiciones de cultivo de la planta. Según su estructura, pueden clasificarse en dos grupos: Compuestos que contienen enlaces dobles conjugados y compuestos con un anillo porfirínico coordinados con metales (que también tienen enlaces dobles conjugados). Los carotenoides y las antocianinas pertenecen al primer grupo y las clorofilas al segundo (Anexo N°2).

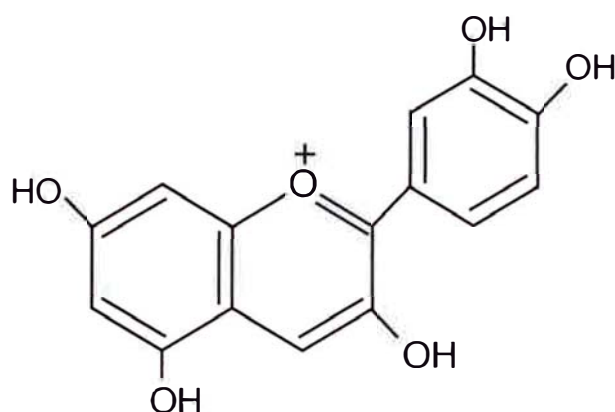


Figura N° 1.1.- Estructura de la Cianidina

Las *antocianinas*, de estructura muy similar a la de los flavonoides, están basadas químicamente en una única estructura aromática, la de la cianidina, cuya estructura se muestra en la Figura N° 1.1.

Las antocianinas como pigmento naturales *inocuos*, tienen considerable potencial en la industria de los alimentos, ya que, son pigmentos naturales solubles en agua bastantes conocidos pues determinan la coloración característica de una gran variedad de vegetales, desde el azul, pasando por el morado hasta el rojo . Se encuentran principalmente en flores, frutas, pero también están presentes en algunas verduras, por ejemplo: el rábano, la berenjena, la col morada, la papa roja, etc; todos ellos usados en la alimentación humana. Estos colorantes han sido, por lo tanto, consumidos por el hombre en incontables generaciones sin causar aparentemente cualquier efecto sobre la salud. A pesar de eso, su uso como aditivo natural está bastante restringido, ya sea por limitaciones en la disponibilidad de materia prima productora de colorantes en la cantidad y calidad requerida, por dificultades en su purificación, por tener un poder colorante reducido cuando es comparado con los productos sintéticos, o principalmente, por la baja estabilidad presentada por las antocianinas. El conocimiento de la estructura de las antocianinas, la influencia de los factores que determinan sus estabilidad como el pH, temperatura, presencia de ácidos, azúcares, ácido ascórbico, iones metálicos y fundamentalmente la presencia de sustancias llamadas copigmentos, asumen una importancia fundamental en el estudio de la estabilidad de las antocianinas, mejorando la perspectiva de incrementar su uso como colorantes de alimentos.

3.- Evaluación de la toxicidad

Antes de aceptar el uso de un aditivo, por ejemplo, (los colorantes sean aceptados en la alimentación), éste debe haber sido sometido a una adecuada evaluación toxicológica. Una vez que la necesidad tecnológica y la valoración para el consumo de los aditivos se ha establecido, se necesita conocer las implicaciones sanitarias del uso de los mismos.

Es necesario determinar por pruebas toxicológicas si la sustancia se ajusta a los niveles de seguridad deseados para su uso como aditivo. A partir de la dosis más elevada que no haya producido efectos adversos en el animal, se fija el factor de inocuidad y con estos datos se establece la **Ingesta Diaria Admisible (IDA)**. La IDA se define como la cantidad media de la sustancia que puede ingerirse diariamente a través de la dieta, aún durante toda la vida sin riesgos detectables, tomando en consideración todo los factores conocidos hasta el momento de la evaluación. Se expresa en miligramos de sustancia ingerida por kilogramo de masa corporal y por día, en tanto , es evidente que, cuanto mayor sea el organismo tanto mayor será la posibilidad de dilución de la sustancia potencialmente nociva, así como la capacidad para destruirla o expulsarla.

La ingesta diaria admisible para una sustancia, y en particular para un aditivo alimentario, se establece casi siempre a partir de modelos experimentales con animales. El valor habitual es el resultado de dividir por 100 la cantidad más alta que no produce efecto en ninguna especie animal de la utilizadas y se denomina **NOEL** (NO Effect Level). Este sistema incluye dos factores de seguridad, primero, el que la especie humana sea 10 veces más sensible que la más sensible entre las especies de experimentación, y segundo, que entre las persona que puede haber individuos hasta 10 veces más sensibles de lo normal.

Para aprobar la utilización de los aditivos en los alimentos existen dos Organismos encargados de realizar la evaluación toxicológica y elaboración de normas de identidad y pureza así como la determinación de su inocuidad basándose en los estudios realizados en animales de experimentación, con diversas dosis y periodos prologados, estos Organismos son el Comité de Expertos de la Food and Agriculture Organization of the United

Nations-Organización Mundial de la salud- (**FAO/OMS**), Join Expert Committee on Food Additives, (**JECFA**) y el Comité Científico para la Alimentación Humana (**CCAH**) de la Unión Europea.

Todos los aditivos que aparecen en la «lista positiva» han sido previamente evaluados por la JECFA y por el CCAH. Cuando los comités consideran insuficiente la información disponible pueden establecer o no un IDA provisional, y eventualmente recomendar los nuevos experimentos necesarios.

Desde una perspectiva sanitaria los aditivos alimentarios plantean un problema derivado de su potencial acción tóxica y será por lo tanto necesario realizar una serie de ensayos toxicológicos para demostrar su inocuidad así como una serie de ensayos especiales.

Ensayos necesarios para demostrar la inocuidad de los aditivos alimentarios :

Ensayo de toxicidad aguda .

Ensayo de toxicidad subaguda (a corto plazo)

Ensayo de toxicidad agudacrónica (a largo plazo) .

Ensayos especiales

Ensayos especiales para demostrar la inocuidad de los aditivos alimentarios :

Funciones de reproducción y del comportamiento

Neurotoxicidad

Teratogénesis

Carcinogénesis

Mutagénesis

Reacciones alergizantes

Reacciones sinérgicas

Reacciones inmunológicas

Impacto ambiental

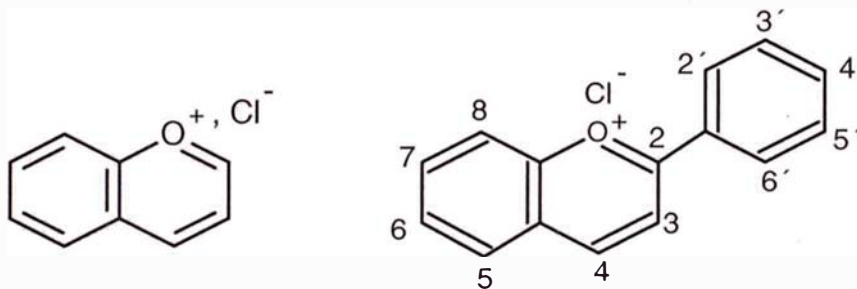
Efectos sobre la flora intestinal y posible creación de cepas resistentes.

B.- ANTOCIANIDINAS Y ANTOCIANINAS

1.- Antocianidinas

El término antocianina (del griego: *anthos* = flor; *kianos* = azul) fue utilizado por Marquat en 1835 para designar a los pigmentos azules de las flores. Más tarde se descubrió que no solo el color azul, sino que también el púrpura, violeta, magenta, y todos los tonos rojos, rosado, escarlata que aparecen en muchas flores, frutos, algunas hojas y raíces de plantas se deben a esta familia de pigmentos.

El núcleo general de las antocianidinas es el **cloruro de 2-fenilpirilio** o **cloruro de flavilio**, propuesto por Everest y Willstätter en 1913 (Figura N° 1.2) y están consideradas dentro del grupo de los flavonoides, ya que poseen el esqueleto característico $C_6 - C_3 - C_6$, el mismo origen biosintético, pero difieren en que absorben fuertemente en la región visible del espectro.

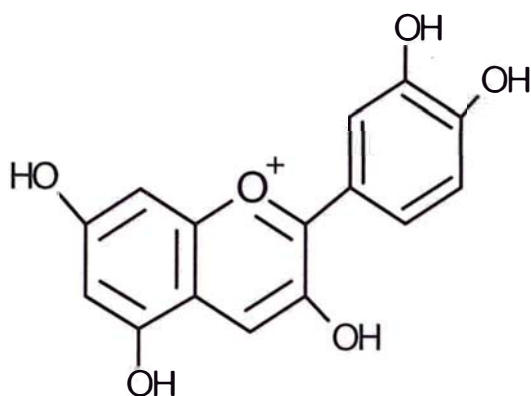
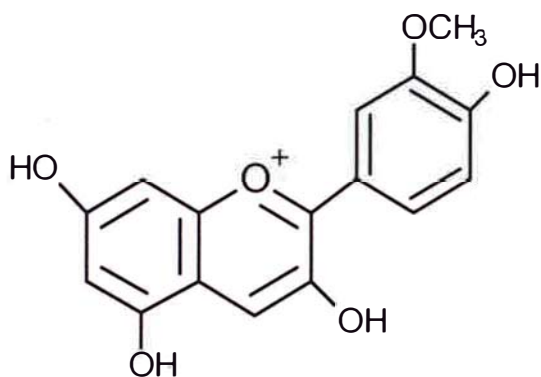
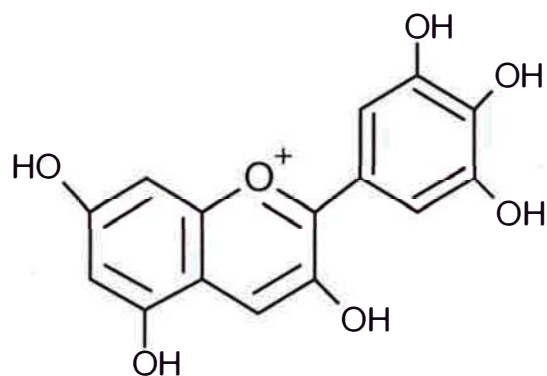
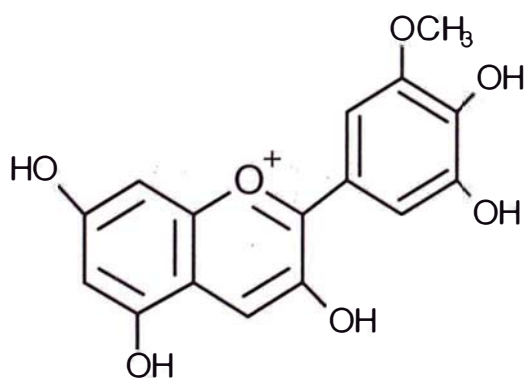


Cloruro de benzopirilio

cloruro de flavilio

Figura N° 1.2.- Estructura del núcleo-base de las antocianidinas

Estos dos investigadores, separaron la cianidina (Figura N° 1.1), a partir de unas flores azules y reconocieron que era un diglicósido y propusieron el término *antocianidina* y *antocianina* (Figura N° 1.3) para el aglicona y el glicósido respectivamente, así como el método para distinguirlos basados en las diferencias de su distribución entre alcohol amílico y las soluciones acuosas ácidas.

**Cianidina (Cy)****Pelargonidina (pg)****Peonidina (Pn)****Delphinidina (Dp)****Petunidina (Pt)****Malvidina (Mv)****Figura N°1.3.- Antocianidinas de mayor abundancia natural(23)**

Un total de 22 antocianidinas son conocidas, 4 de las cuales se encuentran sólo como productos de proantocianidinas (20). Ellos van de la Apigenidina (gesneridina), separado por primera vez como un 5 - glucósido, a partir de *Gesneria Fulgens* (21), hasta Hirsutidina, obtenido por primera vez a partir de la *Primula Hirsuta* (22) (Anexo N° 4, gesneridina). La variación en el patrón de sustitución es más limitado, 12 de los compuestos están basados en la estructura dada en (Figura N° 1.4) con el 3,5,7-trihidroxisustituidos, que son los patrones más esperados en el campo de la biosíntesis. Los glicósidos de 3 de estas antocianinas: **cianidina, delphinidina y pelargonidina** (Figura N° 1.3) son los más comunes en la naturaleza; derivados que están presentes en el 80 % de los pigmentos de las hojas, 69 % en frutos y 50 % en flores. En contraste, las antocianidinas que carecen del grupo hidroxilo en C-3, (3-desoxiantocianidinas) son relativamente raros en la mayoría de las plantas (Anexo N° 6).

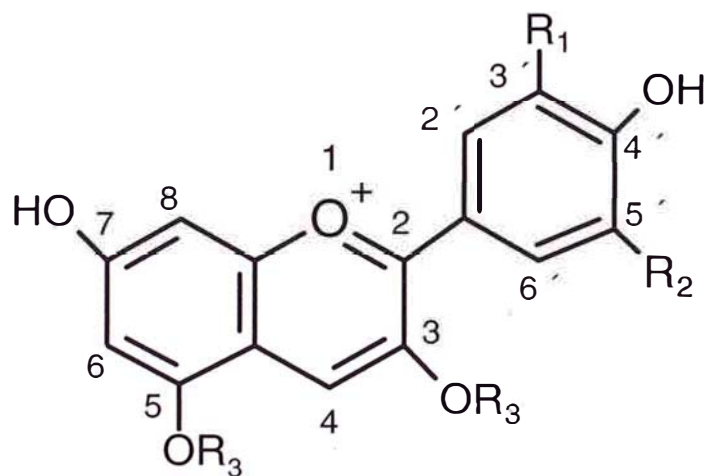


Figura N° 1.4.- Numeración del núcleo-base, de las antocianidinas

Hay seis antocianidinas (agliconas de las antocianinas) comunes, siendo la cianidina la más común y responsable del color magenta, los colores rojo-naranja se deben a la pelargonidina (con un grupo menos que la cianidina), mientras que los colores violeta y azul a la delphinidina (con un grupo hidroxilo más). También existen tres metil-éteres comunes: peonidina, derivada de la cianidina, y petunidina y malvidina, basadas en la delphinidina.

2.- Antocianinas

Todas las antociananidinas comunes que existen en la naturaleza principalmente se encuentran como glicósidos - *antocianinas* -, y a menudo más de un derivado de la misma aglicona está presente en una determinada planta (20). En la actualidad ya se conocen alrededor de 40 diferentes tipos de antocianinas glicosídicas.

Los azúcares que se han encontrado en los antocianos glicosídicos incluyen desde simples hexosas y pentosas (monósidos) hasta disacáridos (Figura N° 1.5) y trisacáridos (biósidos y triósidos) generalmente combinados por enlaces β glicosídicos.

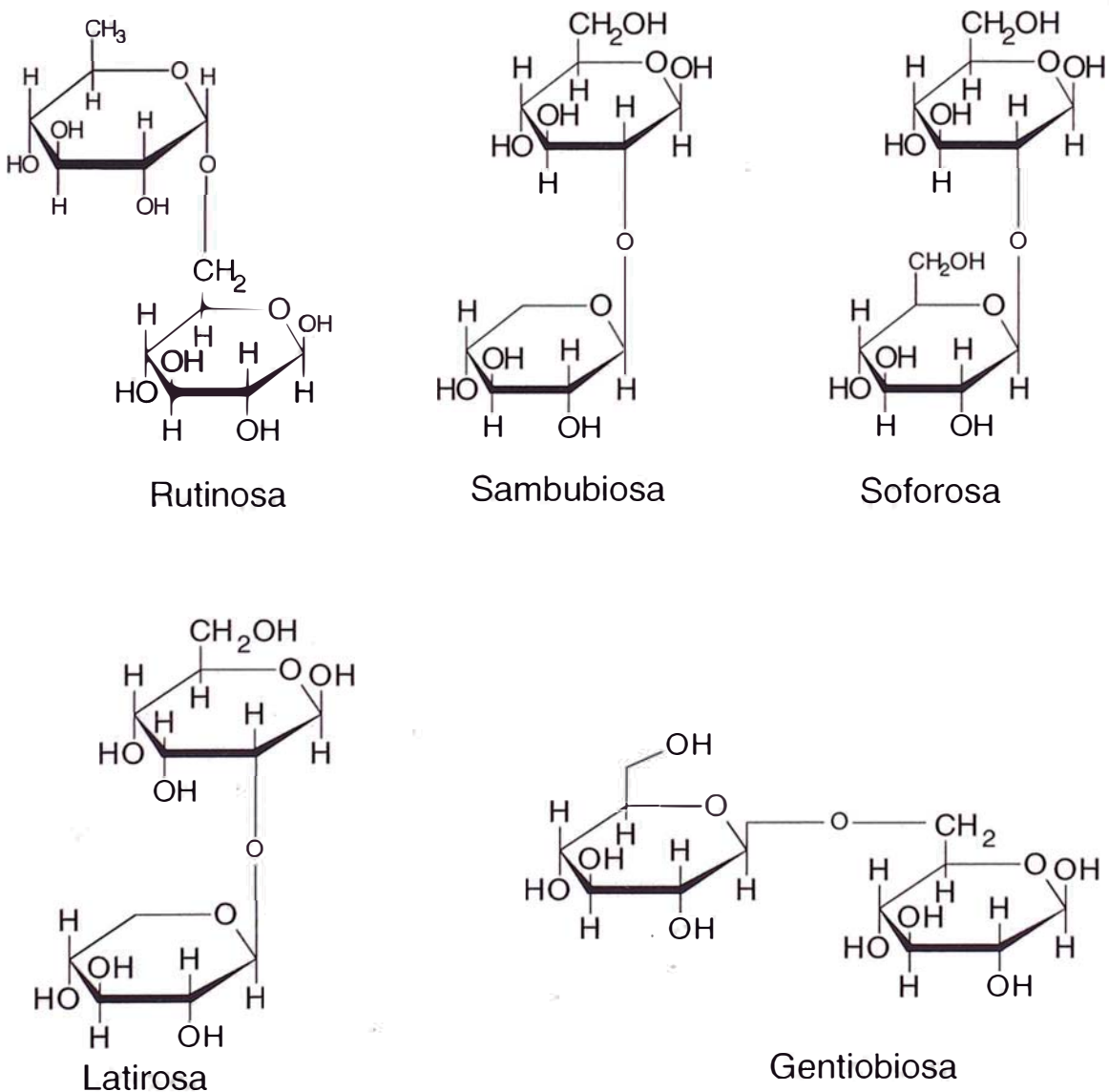


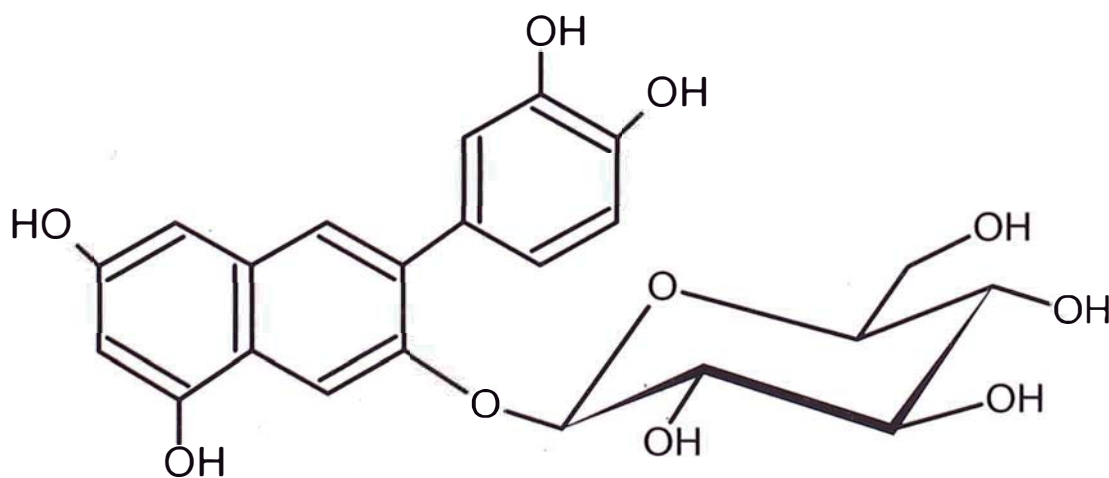
Figura N° 1.5.- Biósidos de mayor frecuencia en la formación de antocianinas

En muchos casos, más de un grupo - OH fenólico de la molécula de antocianidina puede ser monoglicosidado, diglicosidado, siendo la D-glucosa el azúcar más común que puede encontrarse sólo o como parte de un disacárido (Figura N° 1.5). La D-galactosa y L-ramnosa son menos frecuentes, y la L- arabinosa, ácido D-glucurónico y la D-xilosa aún más raros.

Investigaciones recientes ha mostrado que la L - arabinosa (mediante enlaces α - glicosídicos), la D-xilosa, D-fructosa (ambos como monósidos) y un sólo oligosacárido han sido reportados en algunas antocianidinas (20).

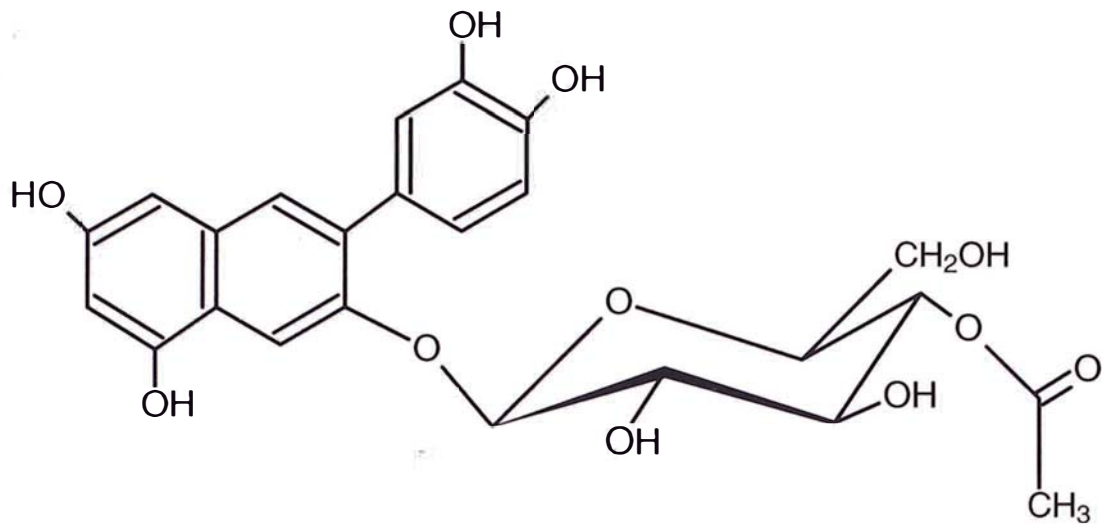
Aunque la glucosa es todavía el único azúcar reportado en el OH del C-5, hay evidencia de que la galactosa, arabinosa y xilosa pueden unirse a la glucosa, formando diglicósidos en el OH del C-7. Sólo unos cuantos disacáridos han sido encontrados en las antocianinas. Por ejemplo: el ramnosilglucósido (rutisona α -1,6), dos glucosilglucósidos (soforosa β -1,2 y gentiobiosa β -1,6), un xilosilglucósido (sambubiosa β -1,2), y la latirosa han sido observados, siendo el primero de ellos relativamente el más común.

También hay un número raro o casi único de biósidos encontrados en antocianinas que incluyen arabinosilglucósidos, galactosilglucósidos y ramnosilglucósidos, triósidos raros e incluyen 2^o-xilosil y 2^o- glucosilrutinosa así como un glucosilramnosilglucósido lineal.

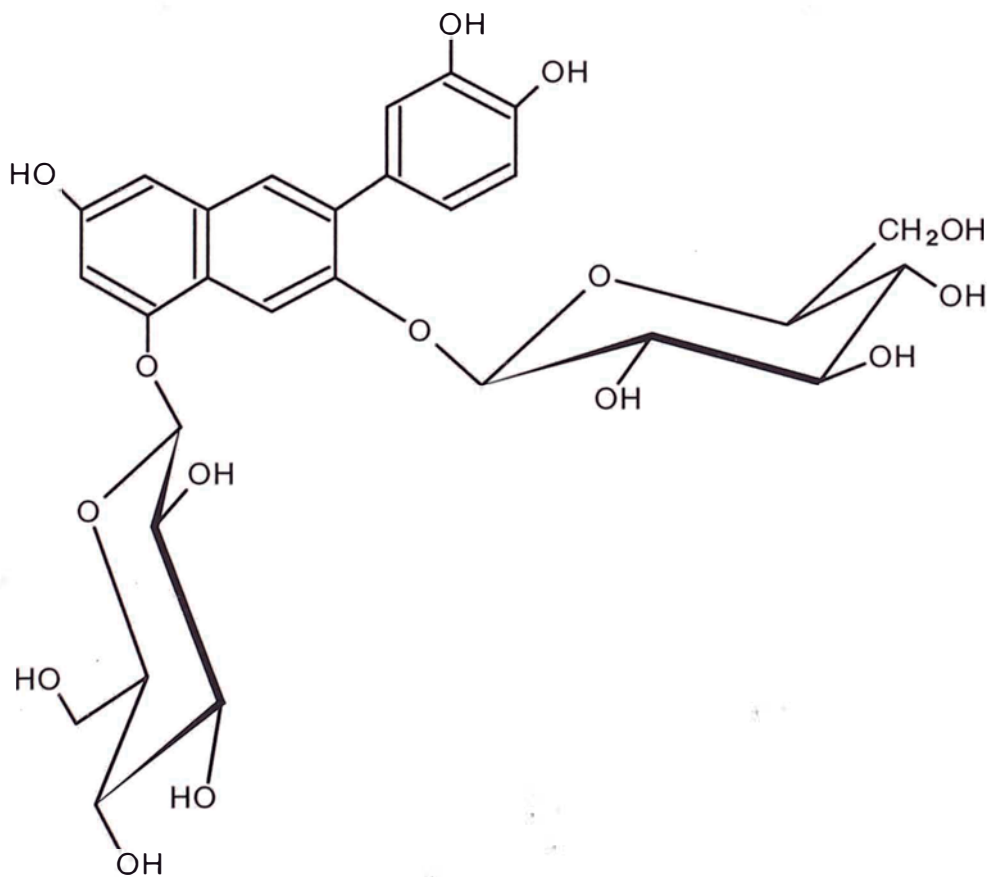


Estructura de la cianidin - 3 - O - (β - D - glucopiranosido)

Figura N° 1.6.- Ejemplo de la nomenclatura de las antocianinas

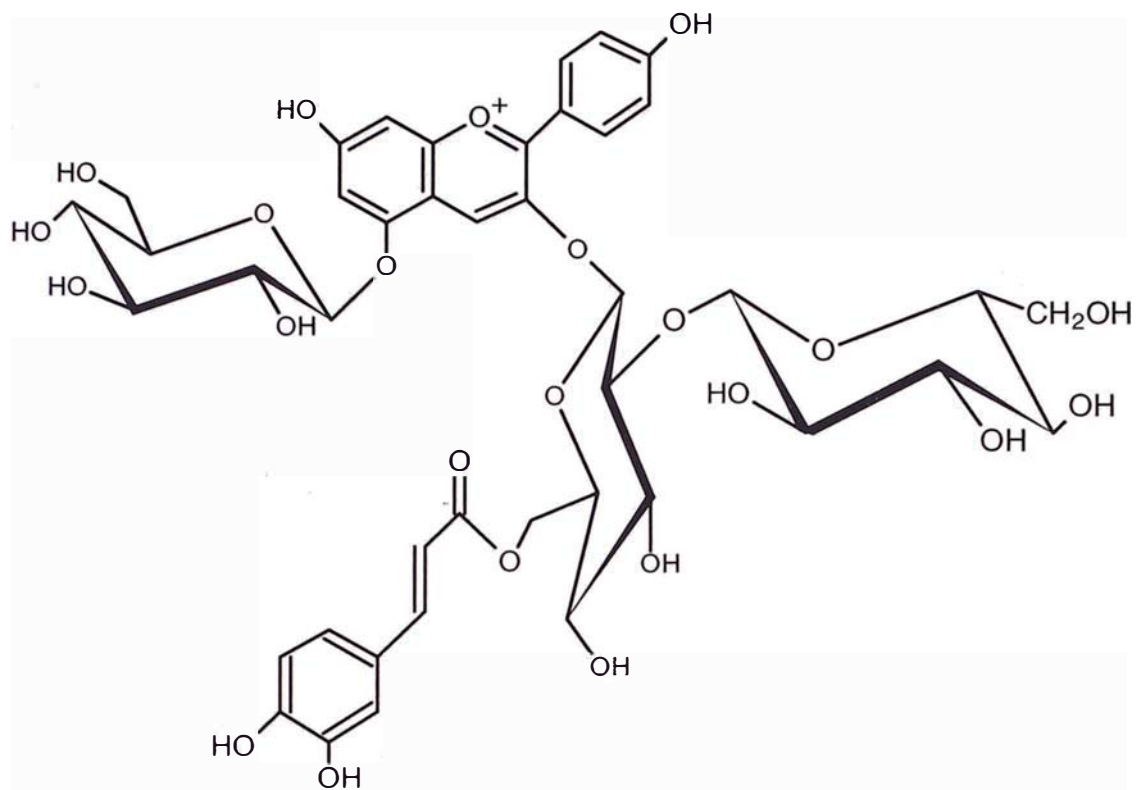


Estructura del cianidin - 3 - O - (4 - O - acetil - β - D - glucopiranosido)

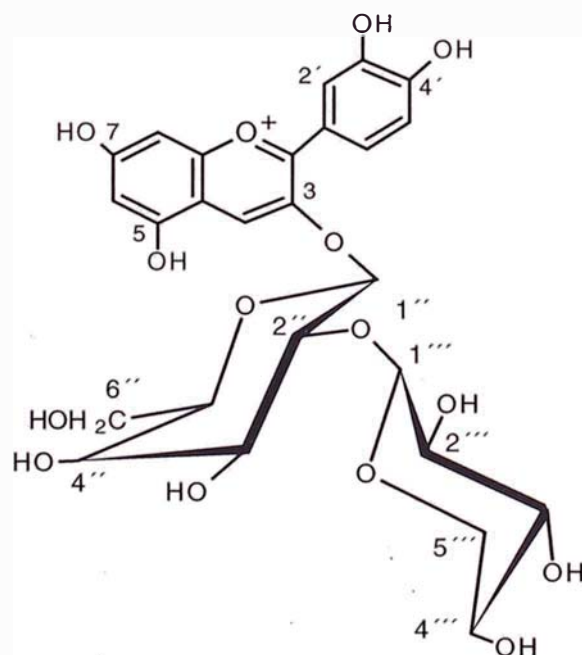


Estructura de la cianidin - 3 , 5 - di - O - β - D - glucopiranosido

Continuación de Figura N° 1.6



Estructura de la pelargonidin 3-O-[6-O-trans-cafeil-2-O-(β -D-glucopiranosil)- β -D-glucopiranosido]-5-O-(β -D-glucopiranosido)



**Estructura de la cianidin-3-latirósido (Cy 3-lat) .
Cianidin 3-O- (2-O- (β -D-xilopiranosil)- β -D-galactopiranosido)
Continuación de Figura N^o 1.6**

Las antocianinas se encuentran principalmente en los frutos y las flores de las *angiospermas* y generalmente como mezclas de ellas (23).

Las mayores fuentes alimenticias conteniendo antocianinas pertenecen a las familias de *Vitaceae* (Uva) y *Rosaceae* (fresa, cereza, manzana, pera, etc) otras familias en las que se encuentran son *Oleaceae* (olivo negro), *Cruciferae* (calabaza roja, col morada), *Solanaceae* (Tomacillo, papa roja, camotes), etc.. En el Anexo N° 5 se da una relación de antocianinas y su ocurrencia natural. Una referencia más completa se puede encontrar en 24-26.

La distribución de las antocianinas en las partes comestibles de las plantas se resume como sigue :

- * Las antocianinas basadas en la cianidina ocurren con más frecuencia.
- * El porcentaje de ocurrencia de las antocianinas es aproximadamente : 50 % de cianidina, 12 % de pelargonidina ,12 % de peonidina , 12 % de delphinidina , y 7 % de petunidina y 7 % de malvidina.
- * Respecto a los antocianinas, los 3-glicósidos tienen una ocurrencia 2,5 veces mayor que los 3,5-diglicósidos siendo el más común el cianidin-3-glucósido.
- * Algunas antocianinas notablemente aciladas 3,5 y 3,7-diglicosidadas, son particularmente estables en ciertas flores azules sin necesidad de copigmentación con metales complejos. Muchas de ellas basadas en delphinidina, aunque algunas derivadas de la peonidina están dotados de esta característica como se observa en los pétalos de *Ipomea tricolor* .

C.- COLOR Y ESTRUCTURA

1 .- Teoría del color

La naturaleza es rica en colores. Algunos colores, como en las plumas del colibrí o del pavo real, se originan por la difracción de la luz por la estructura única de las plumas. Sin embargo, la mayoría de los colores que ocurren en la naturaleza se deben a la absorción de

ciertas longitudes de onda de luz visible por los compuestos orgánicos.

En los inicios del establecimiento de la estructura de los colorantes se empezaron a establecer relaciones entre la misma y el color de los compuestos orgánicos. Por ejemplo, C. Graebe y C. Liebermann, ya en el año 1868, sólo ocho años después de la introducción del concepto de estructura por A. Blutlerov, postularon que todas las combinaciones orgánicas coloreadas poseían naturaleza insaturada, y O.N. Witt estableció su teoría generalizada sobre el color, que contenía ya muchas afirmaciones hasta hoy utilizadas.

Antes de que se desarrollaran las teorías de las transiciones electrónica, se había observado que ciertos tipos de estructuras orgánicas tienden a originar color mientras que otras no lo hacen. Estas estructuras parciales necesarias para la aparición de color (grupo insaturados capaces de experimentar transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ o $n \rightarrow \pi^*$) fueron denominadas *cromóforos* (Figura N° 1.7), término creado en 1876 por Witt, a partir de las raíces griegas *chromos*, “color” y *foros*, “soportar”.

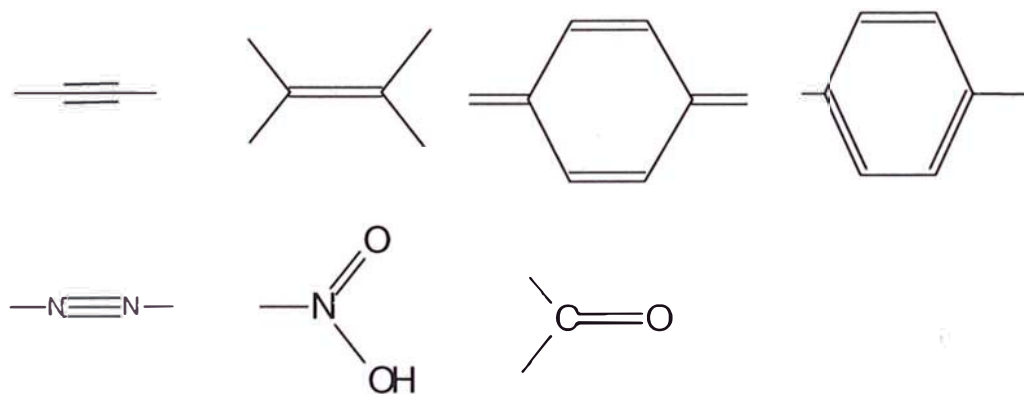
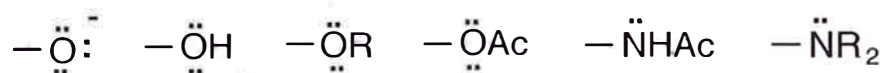


Figura N° 1.7.- Ejemplos de algunos cromóforos

Se observó también que la presencia de otros grupos que no comunicaban color a las combinaciones saturadas, pero sí tienen la propiedad de intensificar considerablemente la acción colorante de los cromóforos antes mencionados, tanto disminuyendo el tono del color como aumentando la intensidad de mismo. Estos grupos fueron denominados *auxocromos*

(del griego *auxanein*, "aumentar"). Actualmente sabemos que estos grupos auxocromos son entidades que no pueden experimentar transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ pero sí transiciones de electrones $n \rightarrow \pi^*$ y la introducción de tales grupos *auxocromos* transforma, por tanto, a los cromóforos en colorantes propiamente dichos.



Pero no los grupos $-\text{NH}_3^+$ o $-\text{NR}_3^+$

Figura N^o 1.8.- Ejemplo de algunos auxocromos

A continuación se muestran ejemplos de colorantes formados por la unión de un cromóforo y un auxocromo (Figura N^o 1.9).

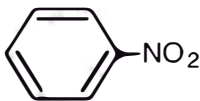

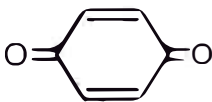
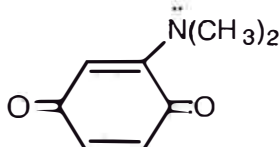
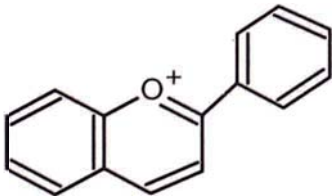
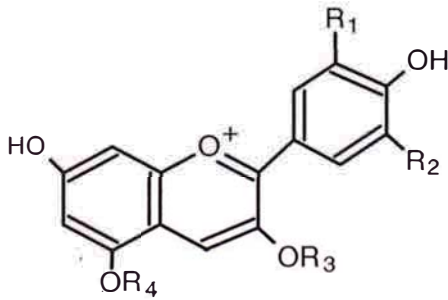
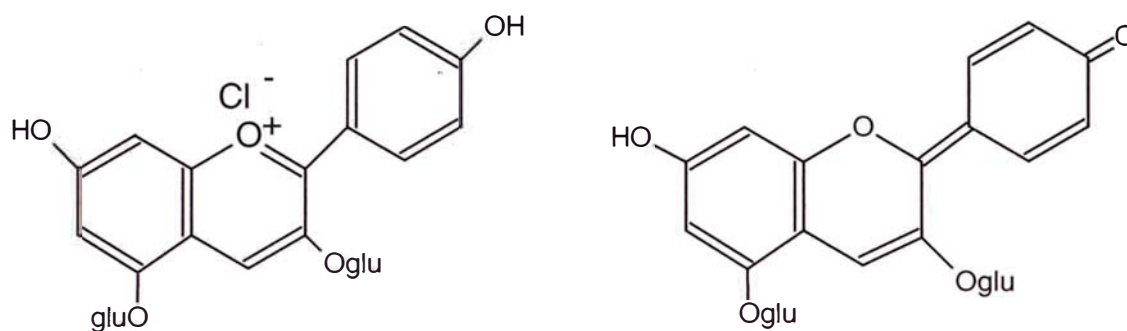
<i>Cromóforo</i>	<i>auxocromo</i>	<i>Colorante resultante por combinación de</i>
 amarillo pálido	$\ddot{\text{N}}\text{H}_2$ Incoloro	 Amarillo intenso
 Amarillo	$\ddot{\text{N}}(\text{CH}_3)_2$ incoloro	 Pardo oscuro
 Incoloro	$\ddot{\text{O}}\text{H}$ Incoloro	 De violeta hasta rojo de acuerdo a los sustituyentes R

Figura N^o 1.9.- Colorantes formado por la unión de un cromóforo y un auxocromo

La acción cromogénica de las antocianinas responsable del color de la mayoría de las flores rojas y azules puede variar, en parte, con el pH del medio. Por ejemplo, El color azul de las flores del aciano y el color rojo de las rosas se deben a la misma antocianina, la *cianina*. En las flores azules del aciano, la cianina se encuentra en su forma de base conjugada del grupo fenólico. Mientras que, en las rosas rojas, la cianina se encuentra en su forma fenólica (Figura N° 1.10).



Cloruro de cianidina -rosas rojas

Aciano - Azul

Figura N° 1.10.- Estructura de los pigmentos de las rosas rojas y del aciano

2.- Estructura y pH

Las antocianinas se comportan como indicadores ácido-base y se presentan en medio ácido en forma de sus sales entre violeta y rojas, mientras que en medio alcalino se encuentran en forma de sus bases libres correspondientes, a las tonalidades azules o azul-verdosas. Como no contienen nitrógeno deben ser *sales de oxonio* y las correspondientes bases oxigenadas (Figura N° 1.11).

Las antocianidinas deben su basicidad a la estructura **I**, lo que permite considerarlas como fenilen-homólogos de las α - pironas. Es decir, la protonación ocurre sobre el átomo de oxígeno en posición 4', con aromatización de los dos anillos hexagonales y formación del ion oxonio (o pirilo) **II**. La sorprendente estabilidad de las sales de las antocianidinas frente a la hidrólisis a pH por debajo de 7 debe atribuirse a la liberación del calor correspondiente

a la doble aromatización (27).

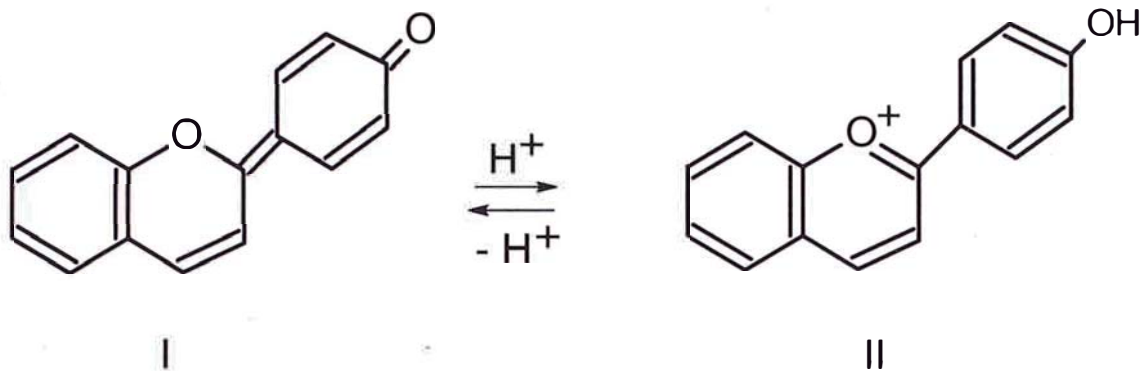


Figura N° 1.11.- Reacciones ácido-base de las sales de flavilio

Las propiedades colorantes de los antocianos (y antocianidinas) no tienen nada que ver con su naturaleza de compuestos oxonio. Esto se deduce ya del hecho de que las bases oxigenadas neutras (azules) presentan un color más profundo que las sales de oxonio ionógenas (rojas). El color debe atribuirse más bien, como de ordinario, a la existencia de un sistema de electrones π extenso y conjugado, oscilante entre grupos *auxocromos* y *antiauxocromos*. Sin embargo, en esta mesomería participan además de los átomos representados en **I** y **II**, los átomo de oxígeno hidroxílico en posición 7, de modo que solamente **III** puede considerarse como la combinación más simple con las propiedades colorantes correspondientes a un antociano. Sin embargo, la combinación **III**, que en sí no tiene que poseer un color profundo, es tan rica en energía a causa de la desaromatización de dos anillos hexagonales, que en medio acuoso o bien acepta con protón para formar el ion oxonio **IV** \leftrightarrow **V** \leftrightarrow **VI**, o bien se desprotona formándose el anión **VII** \leftrightarrow **VIII**, pues ambos iones se encuentran mucho más estabilizados por mesomería que la base **III**. Por tanto, la adición de álcalis a la disolución de la sal de oxonio provoca la transferencia de dos protones para dar el anión **VII** \leftrightarrow **VIII** pasando por encima del estado **III** (Anexo N° 7).

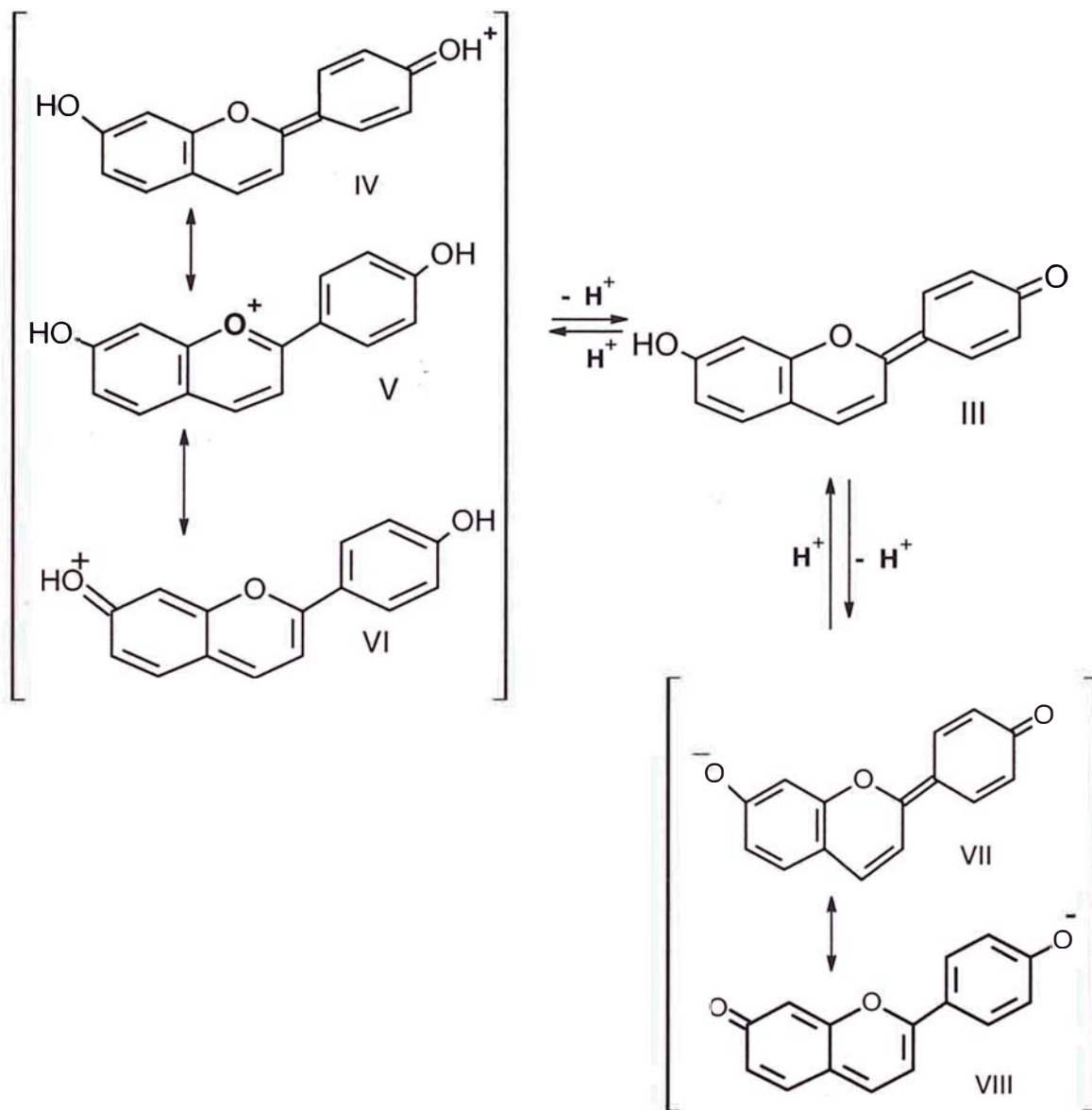


Figura N° 1.12.- Reacción ácido-base y mesomería de las antocianidinas relacionadas con el color

Tanto en el catión $\text{IV} \leftrightarrow \text{V} \leftrightarrow \text{VI}$ como los aniones $\text{VII} \leftrightarrow \text{VIII}$ existen sistemas conjugado de electrones π , típicos productores del color, cromóforos. En V (como estructura fundamental) funciona el enlace $\text{C} = \overset{+}{\text{O}}$ del anillo pirilio como grupo antiauxocromo, que entra en interacción con el grupo $-\text{OH}$ que se encuentra en posición 4' y también con el que se encuentra en posición 7, a través de dos o tres dobles enlaces $\text{C} = \text{C}$. En este caso el color

rojo, como consecuencia de la distancia relativamente pequeña que existe entre los grupos auxocromos y los antiauxocromos. En el anión **VII** \leftrightarrow **VIII** por el contrario, actúa el grupo neutro C = O con posición 4' o 7 como antiauxocromos y entra en mesomería con el grupo C-O⁻ que se encuentra en posición 7 ó 4' como auxocromo a través de seis enlaces dobles C=C, en consecuencia el color se desplaza hacia el azul.

3.- Antocianinas - color y estructura

Los compuestos son coloreados porque ellos absorben luz en la región visible del espectro, esto es, entre 400 y 800 nm y en la región del UV entre 200 y 400 nm. La absorción de la luz causa excitación de los electrones en las moléculas y los electrones más firmemente enlazados requieren de mayor energía (menores λ) para la luz absorbida. Así, hidrocarburos saturados muestran absorción \sim 160 nm, pero compuestos que contienen dobles o triples enlaces y/o heteroátomos, con electrones no enlazantes muestran absorciones a mayores λ .

En la actualidad es reconocido que la presencia de conjugaciones, cromóforos y auxocromos en una molécula, determinan las transiciones electrónicas a niveles más altos de energía resultando una estructura de estado excitado. En algunos tipos de cadenas conjugadas, o en el caso de un determinado número ideal de cromóforos y auxocromos, las transiciones electrónicas son más fáciles de llevarse a cabo requiriendo de λ más largas para tales excitaciones.

Estos hechos se ilustran bien en los flavonoides. Las flavonas hidroxí-sustituidas (catequinas, y proantocianidinas, Anexo N° 8) en los cuales no existe conjugación exocíclica en dos anillos bencenos, tienen una sola banda de absorción en su espectro UV-visible como el de los fenoles simples con $\lambda_{\text{max}} = 275\text{-}280$ nm (Figura N° 1.13).

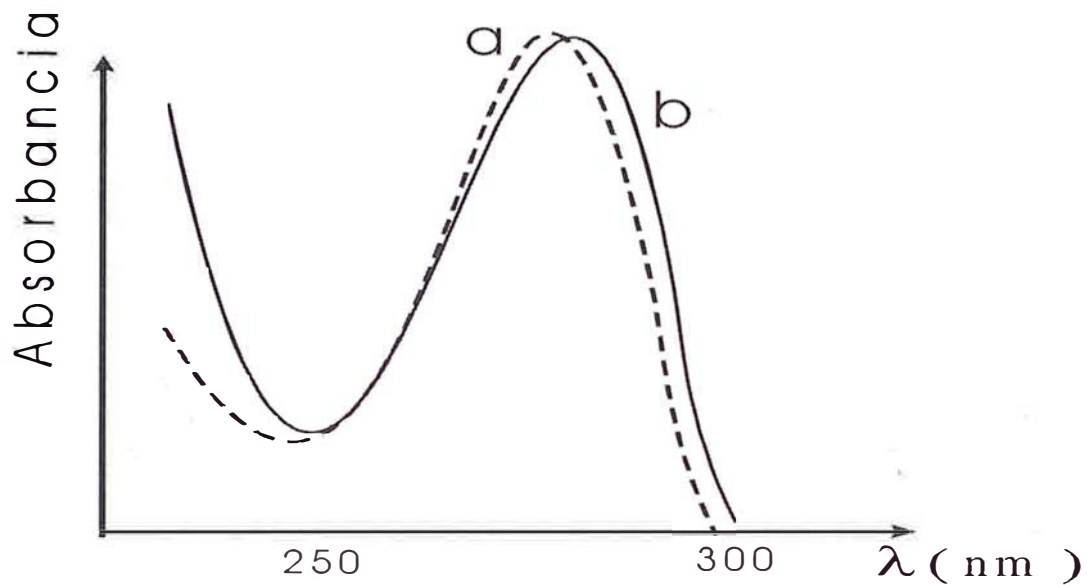


Figura N° 1.13.- Espectro de absorción de: (a) (+)-catequina y (b) catecol en etanol

Similarmente, las flavanonas e isoflavonas (Anexo N° 8) tiene espectros semejantes a las hidroxiacetofenonas, desde que los grupo OH en el anillo **A** están conjugados con el grupo carbonilo C-4 (Figura N° 1.14).

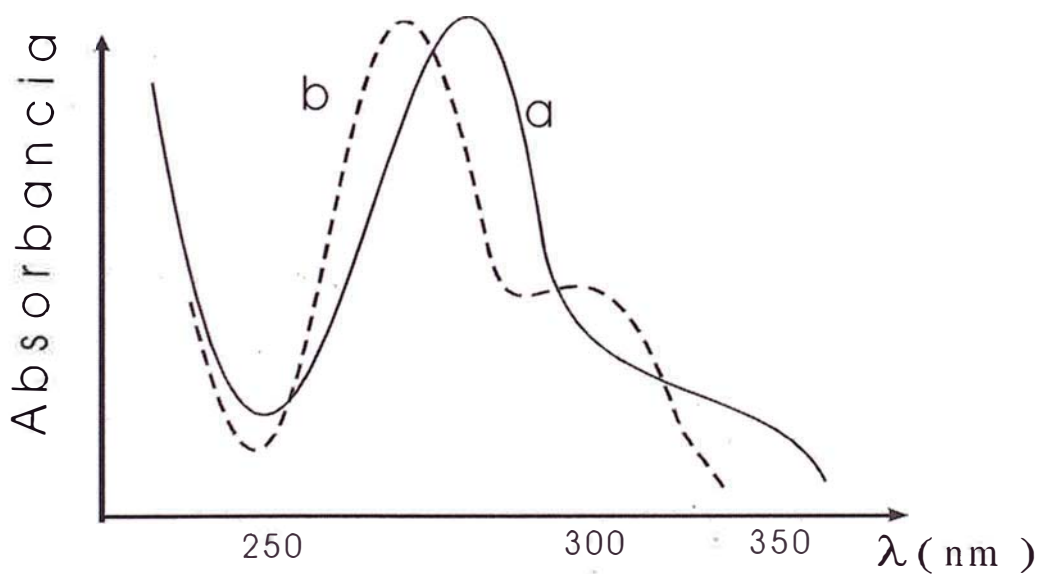


Figura N° 1.14.- Espectro de absorción UV-Visivle de: (a) naringenina y (b) 2,4-dihidroxiacetofenona en etanol(125)

Sin embargo, la conjugación entre los grupos hidroxilo del anillo **B** y el grupo carbonilo en C-4 se convierten en importantes en las flavonas y el espectro resultante consiste de dos bandas separadas de alto coeficiente de extinción molar ($\log \epsilon > 4$). La longitud de onda más larga (**banda I**) esta asociada con la conjugación del anillo **B**, y λ más corta (**banda II**) con el anillo **A** (Figura N°1.15).

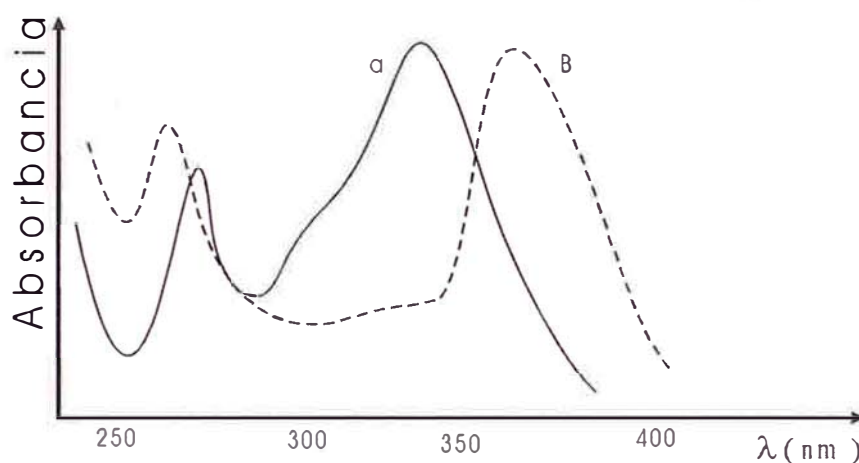


Figura N° 1.15.- Espectro de absorción de (a) apigenina y (b) quercetina en etanol(125)

En compuestos polihidroxisustituídos se presentan bandas individuales con hombros por el solapamiento de varias bandas esto se debe a la contribución de varias formas canónicas, y muchas bandas débiles (principalmente debido a transiciones de los pares libres de los átomos de oxígeno) que están enmascarados o combinados con las bandas más intensas. En los flavonoles, la **banda I** se mueve hacia mayores λ que en las flavonas debido a la contribución de los grupos hidroxilo vinílicos en C-3 (Figura N° 1.15).

En concentraciones suficientemente altas, las soluciones de los flavonoles absorben en la región azul del espectro y aparecerá de color amarillo. Las chalconas presentan un color amarillo más tenue debido a que ellos absorben fuertemente en rangos de λ cortos respecto a los flavonoles. En las auronas, la **banda I** se desplaza hacia mayores λ probablemente debido a la planaridad de los 5 miembros del anillo heterocíclico y consecuentemente se genera un mayor efecto resonante (28).

Las sales de antocianinas en solución ácida, en la cual los electrones del oxígeno

heterocíclico están involucrados en la formación del enlace π y absorben a λ mucho más grandes en algunas clases de compuestos flavonoides (Figura N° 1.16). Se puede mostrar, sin embargo, que soluciones neutras o básicas de las antocianinas forman estructuras tautómeras inestables a partir de la pseudobase o ion fenolato de **I**, y sin embargo tiene diferentes espectros de absorción.

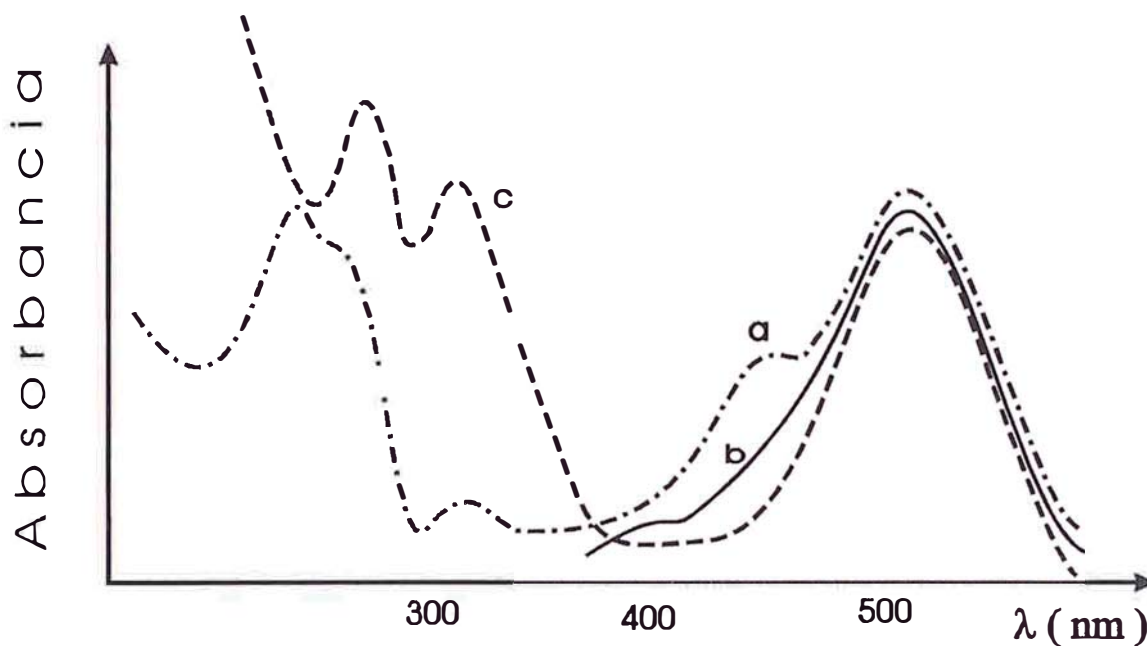


Figura N° 1.16.-Espectro de absorción de: (a) pelargonidina - 3 - glucósido, (b) pelargonidina-3,5-diglucósido y (c) pelargonidina-3-*p*-coumarilglucósido-5-glucósido en 0,01 % de HCl metanólico(125).

Se puede observar, sin embargo, que el incremento de las conjugaciones en los flavonoides permiten absorber a λ más largos en algunos clases de compuestos. Cuando se aumenta la hidroxilación se tiene el mismo efecto , debido al incremento de los electrones no enlazantes proporcionado por los grupos hidroxilo. Naturalmente hay una diferencia en la contribución de cada uno de los grupos hidroxilo, dependiendo de la posición del sustituyente, generalmente en concordancia con lo predicho con la teoría de la química orgánica de los fenoles. La acilación o glicosidación de compuestos flavonoides resulta en un efecto hipsocrómico (menores λ) respecto a la aglicona, generalmente resultando en espectro parecido al del núcleo-pariente . Aquí los electrones no enlazantes de los oxígenos hidroxílicos

están involucrados en resonancia con el propio grupo acilo. La metilación o glicosidación tiene un efecto hipsocrómico mucho menor, excepto cuando el grupo hidroxilo-vinílico de los flavonoles está implicado.

Finalmente uno debe recordar que los espectros de todos los flavonoides están marcadamente alterados cuando el hidroxilo fenólico está ionizado (esto es a un pH ligeramente inferior a 9) o cuando están involucrados en copigmentación o en la formación de un quelato con metales (29). De hecho, se forman colores más profundos cuando el flavonoide es tratado con alumbre de hierro o mordientes similares siendo la base de la tinción de la lana por el uso de colorantes naturales. Por ejemplo, El teñido con *Reseda lutea* L., la cual es conocida desde hace mucho tiempo en Europa, contiene luteolina, la cual difícilmente puede colorear ($\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$), pero cuando la lana es mordentada con sales de aluminio da un atractivo color amarillo ($\lambda_{\text{max}} = 390 \text{ nm}$).

Resumiendo lo anteriormente dicho, el color visible de las antocianidinas depende del número y orientación de grupos hidroxilo y grupos metoxilo en la molécula y varía de amarillo-naranja (apigenidina, $\lambda = 476 \text{ nm}$) hasta azul (delfinidina, $\lambda = 546 \text{ nm}$). El color también es afectado por el solvente y se desplaza hacia el azul, esto es, λ disminuye entre 5-10 nm en ácido alcohólico que en soluciones acuosas ácidas. Debido al carácter iónico de las antocianidinas, la intensidad del color es marcadamente dependiente del pH, y como se incrementa hacia la neutralidad, mayor cantidad de pigmento es transformado en la pseudo-base incolora (2-hidroxi cromeno) (Anexo N° 8). De acuerdo a los datos Swain y Hills (30) la cianidina (Figura N° 1.1) tiene un $\text{pK}_a \sim 2$, pero los valores para otras sales de flavilio puede ser generalmente más altos.

Se debe notar que sólo la banda I es afectada, la intensidad de la banda II ($\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$) difícilmente cambia cuando el pH se eleva de 1 a 6, la forma de pseudo-base puede sufrir una apertura del anillo para formar la correspondiente chalcona, y otros cambios de descomposición de la antocianina se pueden producir por fotocatalisis en reacciones no reversibles.

A pH ligeramente menor a 7 las antocianidinas forman anhidro-base (Anexo N° 9) y todos tiene una tonalidad azul, los cuales son inestables en agua a menos que el grupo 3-hidroxilo este ausente. Además elevando el pH se induce a la ionización de los grupos fenólicos, pero bajo tales condiciones las antocianidinas son muy inestables, y sufren una división y oxidación con aire y por reacidificación tales soluciones se pueden regenerar parcialmente.

CAPÍTULO II

ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

A.- BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES

1.- Introducción

Se ha estimado que la biosíntesis de los flavonoides representa aproximadamente el 2 % del carbono total fijado por la fotosíntesis de la plantas (31). El amplio espectro de rutas de biosíntesis de los flavonoides, un grupo de productos naturales cuantitativamente importantes, han sido entendidos desde hace tiempo, pero el conocimiento de los detalles sobre las rutas sintéticas no han sido aún precisados. Las investigaciones de años recientes están relacionadas con la elucidación de las etapas individuales y con la separación de las enzimas implicadas en éstas rutas sintéticas.

La biosíntesis de los flavonoides puede ser considerada convenientemente en tres etapas. La primera está relacionada con el esqueleto $C_6-C_3-C_6$ a partir de la combinación de *acetato-malonato* y el *ácido shikímico*, ruta para la formación de compuestos aromáticos. La siguiente etapa está relacionada con la forma por la cual, las diferentes clases de flavonoides son sintetizados en reacciones que se llevan a cabo por etapas y reacciones paralelas a partir del flavonoide prototipo, C_{15} . Este es el área de mayor interés en la biosíntesis de los flavonoides ya que, a pesar de haberse estudiado intensamente no puede decirse aún que se haya entendido del todo. Finalmente se debe considerar la elaboración final de un tipo de

flavonoide en particular, involucrando etapas tales como hidroxilación, glicosidación, etc..

2.- Formación del Esqueleto Base $C_6-C_3-C_6$

Por analogía con la biosíntesis de ácidos grasos, se ha postulado que el esqueleto $C_6-C_3-C_6$ de los flavonoides se forma por la condensación de una unidad C_6-C_3 con tres unidades de acetato-malonato, siendo catalizado por los tioésteres de la coenzima-A(CoA) (32). La unidad C_6-C_3 presumiblemente es el ácido cinámico, quién se transforma en una chalcona como el primer prototipo de flavonoide de C_{15} (Figura N°2.1).

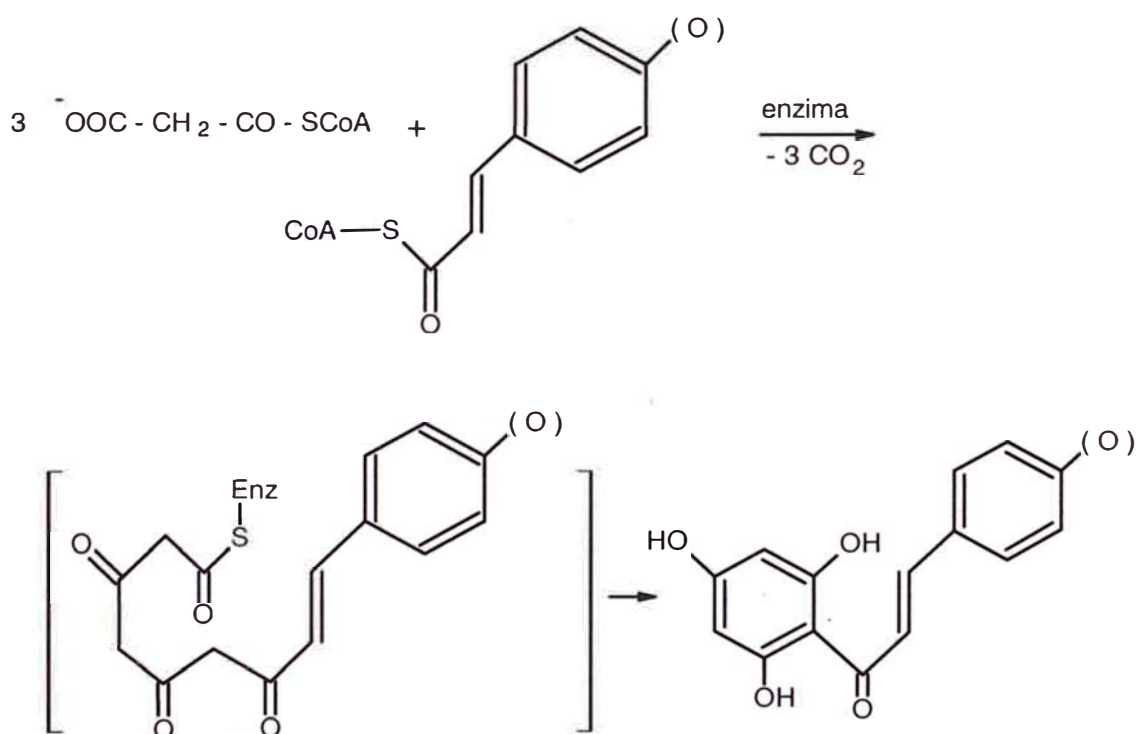


Figura N° 2.1.- Probable origen del esqueleto $C_6-C_3-C_6$ de los compuestos flavonoides(105).

Toda la evidencia disponible es consistente con esta hipótesis, además de las pruebas recientes sobre la separación de la enzima *sintasa chalcona*.

La participación del ácido cinámico en la biosíntesis de los flavonoides une esta ruta con la biosíntesis de la lignina. La fenilalanina es el precursor biogenético inmediato del ácido

cinámico y la enzima responsable para esta conversión es la *fenilalanina amonio liasa* (**PAL**).

Con pocas excepciones, todos los flavonoides poseen oxígeno en la posición 4' del anillo **B**. la «para-oxigenación» es también característica de los compuestos fenilpropanoides. Esto sugiere que el ácido *p*-coumárico, en lugar del ácido cinámico, es el intermediario fenilpropanoide directo de la gran mayoría de los flavonoides. La enzima que cataliza la formación del ácido *p*-coumárico a partir del ácido cinámico es el *ácido cinámico 4-hidroxilasa* (**CAH**) siendo otra enzima clave en la ruta de la biosíntesis de los flavonoides y de la lignina.

La biosíntesis del ácido *p*-coumárico es posible también vía la tirosina (Figura N° 2.2), pero esta ruta es, por lo visto, de importancia sólo en las plantas que pertenecen a la familias de las Gramináceas .

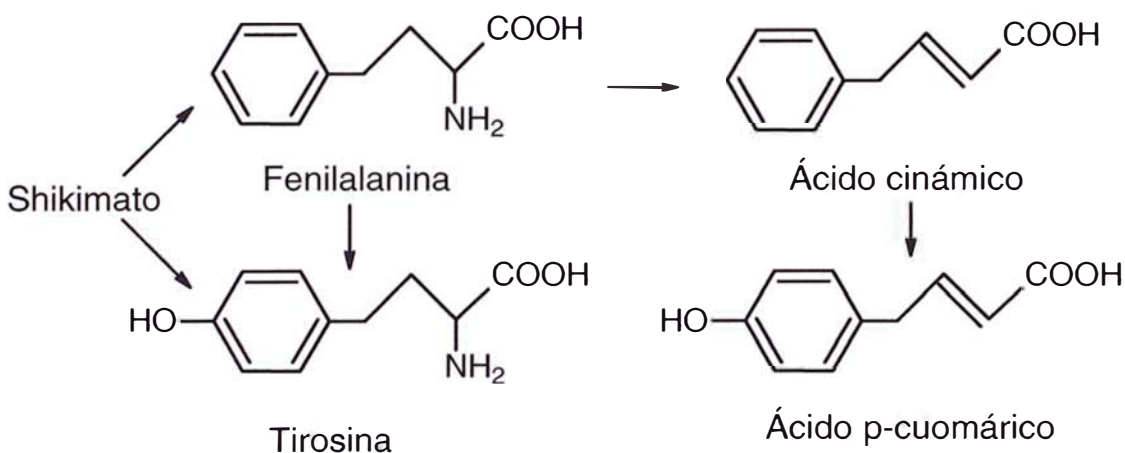
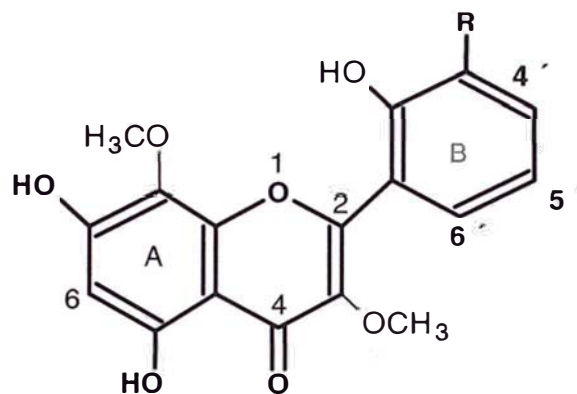


Figura N° 2.2.- Posibles rutas para el ácido *p*-coumárico(105).

La capacidad de combinación de la ruta del acetato- malonato y el ácido shikímico para producir compuestos flavonoides se ha pensado incorrectamente por mucho tiempo que es característica sólo de las plantas superiores, y los reportes esporádicos en el pasado sobre la presencia de flavonoides en microorganismo no ha sido concluyente. Sin embargo, Los compuestos cloroflavonoides (I) y flavoninas (II) (Figura N° 2.3) han sido separados recientemente a partir cultivos de *Aspergillus Candilus* y su status de metabolitos micóticos ha sido probado por la síntesis de *novo* (a partir de precursores sencillos) con

Aspergillus candidus cuando se le administró fenilalanina, marcado isotópicamente (^{14}C). Así los estudios indican que la ruta de síntesis de flavonoides con microorganismos es aparentemente la misma en plantas superiores, al contrario de otros grupos de productos naturales de naturaleza fenólica.



(I) R = Cl

(II) R = H

Figura N° 2.3.- Estructura de los cloroflavonoides (I) y de las flavoninas (II)

a) Fenilalanina amonio liasa (PAL).

La **PAL** es sin duda la enzima clave en el metabolismo de los fenilpropanoides ($\text{C}_6\text{-C}_3$). Desde los primeros reportes de **Kouhol y Conn** (1961), numerosos estudios se han realizado (34). En esta sección solo mencionaremos aquellas propiedades más relevantes de la biogénesis de los flavonoides. La reacción catalizada por **PAL** es la desaminación antiperiplanar de la L-fenilalanina (Figura N° 2.4) para conducir al ácido trans- cinámico (35).

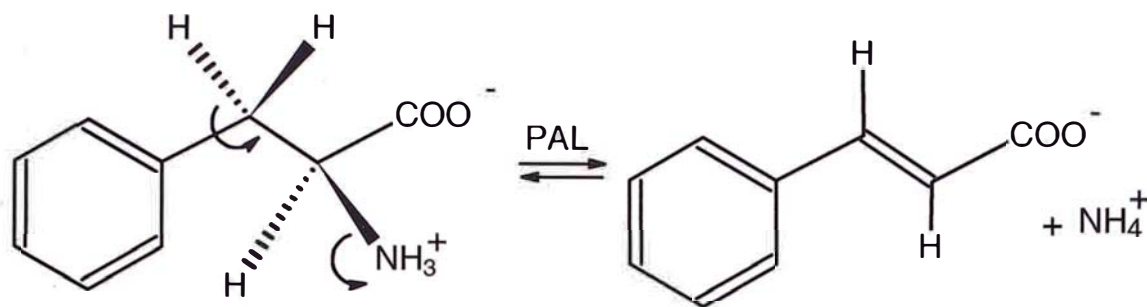


Figura N^o 2.4.- Desaminación de la L-fenilalanina(105).

La reversibilidad microscópica de esta reacción ha sido de mostrada in vitro (36) pero el significado biosintético de la reacción es aún desconocida .

b) Ácido cinámico 4-hidroxilasa (CAH)

El CAH es la segunda enzima clave en la ruta biosintética de los compuestos fenilpropanoides/ flavonoides a partir de la fenilalanina. La separación a partir de la espinaca fue el primer reporte (38). El CAH extraída a partir de la planta de la arveja es una oxidasa de función mixta la cual requiere oxígeno molecular y del NADPH para su actividad .

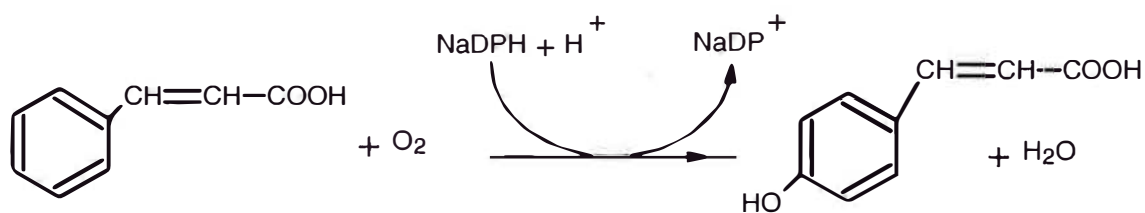


Figura N^o 2.5.- Hidroxilación del ácido cinámico(105).

El CAH parece ser específico para el ácidocinámico. La fenilalanina y el ácido *p*-coumárico no fueron hidroxilados por la enzima . Estudios cinéticos mostraron que CAH tiene una alta afinidad por el ácido cinámico y que es inhibido por una baja concentración de ácido *p*-coumárico. El alto grado de inhibición indica que la concentración de *p*-coumarato en los tejidos es como autorregulador y sugiere que la regulación de la actividad de CAH es un importante punto de control en la biosíntesis de compuestos fenólicos (40).

Se ha mostrado que cuando el ácido [p - ^3H] cinámico es usado como sustrato, alrededor del 93 % del tritio es retenido en la posición *meta* del producto hidroxilado (41). El mecanismo propuesto para la oxigenación y el rearreglo del tritio se muestra en la Figura N° 2.6.

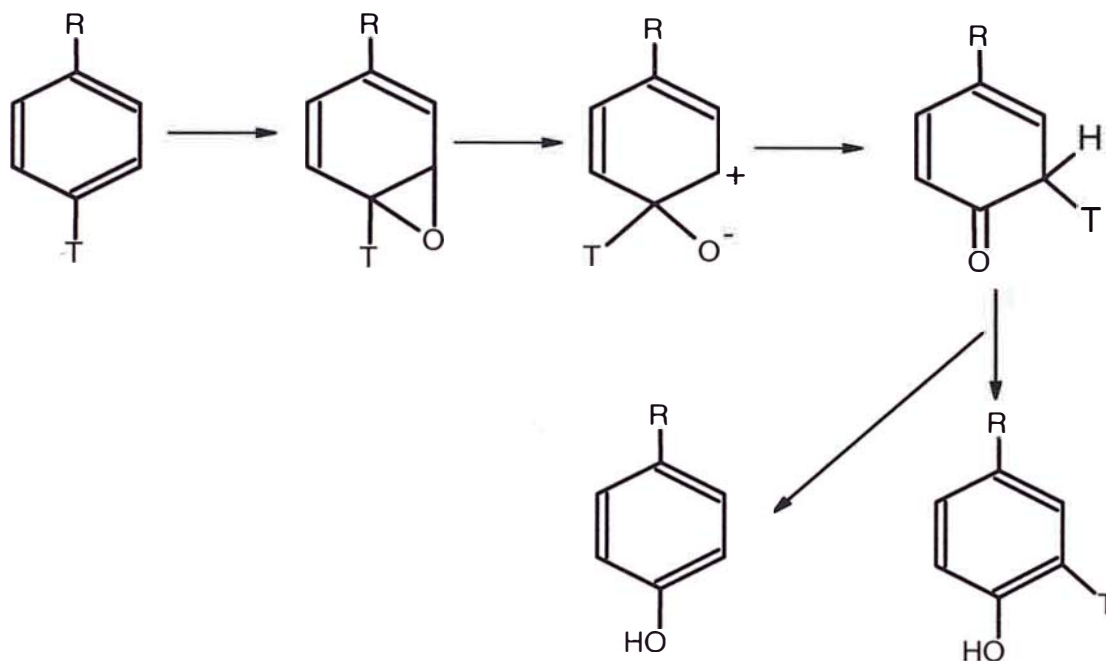


Figura N° 2.6.- Mecanismo propuesto para la formación de fenoles por catálisis con mono-oxigenasa(105).

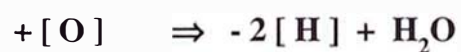
3.- Biosíntesis de los flavonoides

El rol central de la chalcona como el intermediario biogénico común C_{15} de las diferentes clases de flavonoides está ahora bien establecido (42). Los estudios sobre este tema están resumidos en la Figura N° 2.7. La flavanona **naringenina** fue usada como precursor en el desarrollo de determinados experimentos y la correspondiente chalcona puede considerarse definitivamente que está implicado, en la biosíntesis de esta flavanona.

Se ha establecido que todas las clases de flavonoides son derivados de la chalcona. El problema implica entonces dilucidar las clases de relaciones más allá de la etapa de la chalcona. La existencia de una relación directa entre las clases de flavonoides indica que la

síntesis es varias etapas secuenciales y la ausencia de relaciones indica síntesis por etapas paralelas a partir de la chalcona. La bioquímica genética tiene evidencia disponible que sugiere que la combinación de etapas paralelas y etapas secuenciales operan en la biosíntesis de los flavonoides.

La conversión de la chalcona en las otras clases de flavonoides requieren en esencia de reacciones de oxidación y reducción y muchos esquemas basados en analogías químicas han sido propuestos para dichas transformaciones. Desde el punto de vista bioquímico, estas reacciones son presuntamente llevados a cabo mediante enzimas de la *mono-oxigenasa* y *deshidrogenasa*. La catálisis por cualquiera de los dos tipos de enzima pueden en principio llevar a una ganancia neta de oxígeno o a un pérdida neta de 2 átomos de hidrógeno en el sustrato flavonoide y la deshidratación e hidratación son llevados a cabo como procesos auxiliares. Esta situación es resumida en las siguientes ecuaciones estequiométricas:



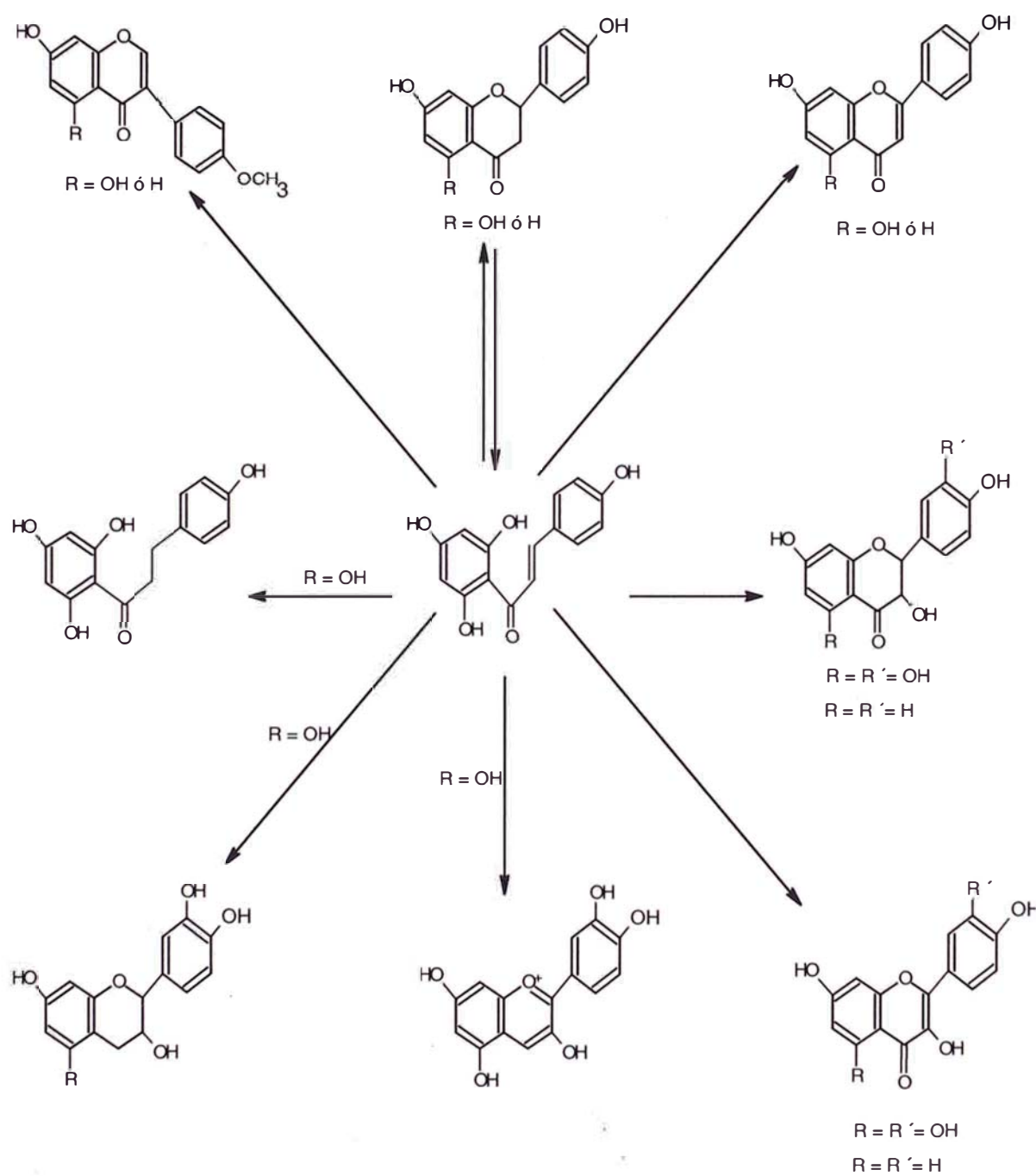


Figura N^o 2.7.- Incorporación de chalconas en otros compuestos flavonoides(105).

4.- Biosíntesis de las antocianidinas

La conversión *in vivo* de los flavonoles en antocianidinas ha sido demostrado en plantas de trigos y arverjas (43). Estos resultados han sido confirmados en experimentos con cultivos de *Haplopappus gracilis*. El dihidrokampeferol fue convertido en cianidina con una eficiencia superior al 12%.

El mecanismo de la conversión de flavonol en antocianidina es materia solo de conjeturas. Desde que estas dos clases de compuestos están formalmente en los mismos niveles de oxidación, los esquemas de reacción involucran etapas no redox, tal como se muestra figura N° 2.8. Se ha sugerido en trabajos recientes (aunque no hay evidencia experimental) la posibilidad de que el flavonol sufra primero una reducción a un nivel equivalente de 3,4-flavanodiol y a continuación este intermediario se convierta por oxidación en la correspondiente antocianidina.

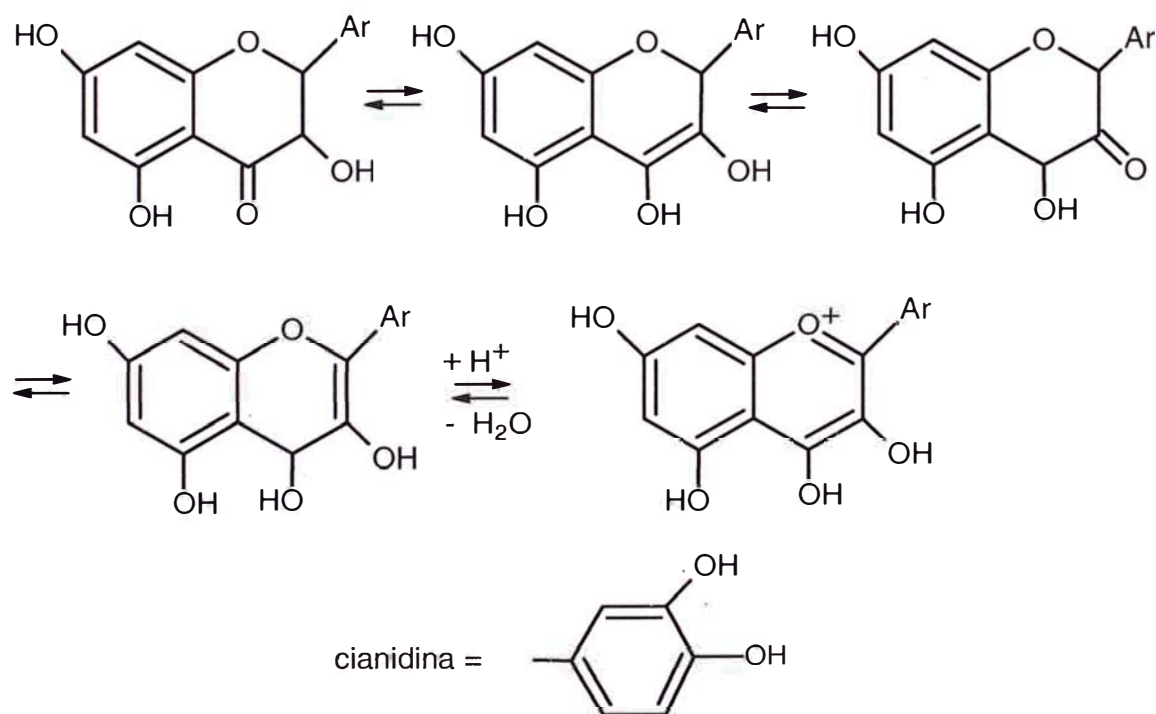


Figura N° 2.8.- Rutas hipotéticas no redox para las antocianidinas(105).

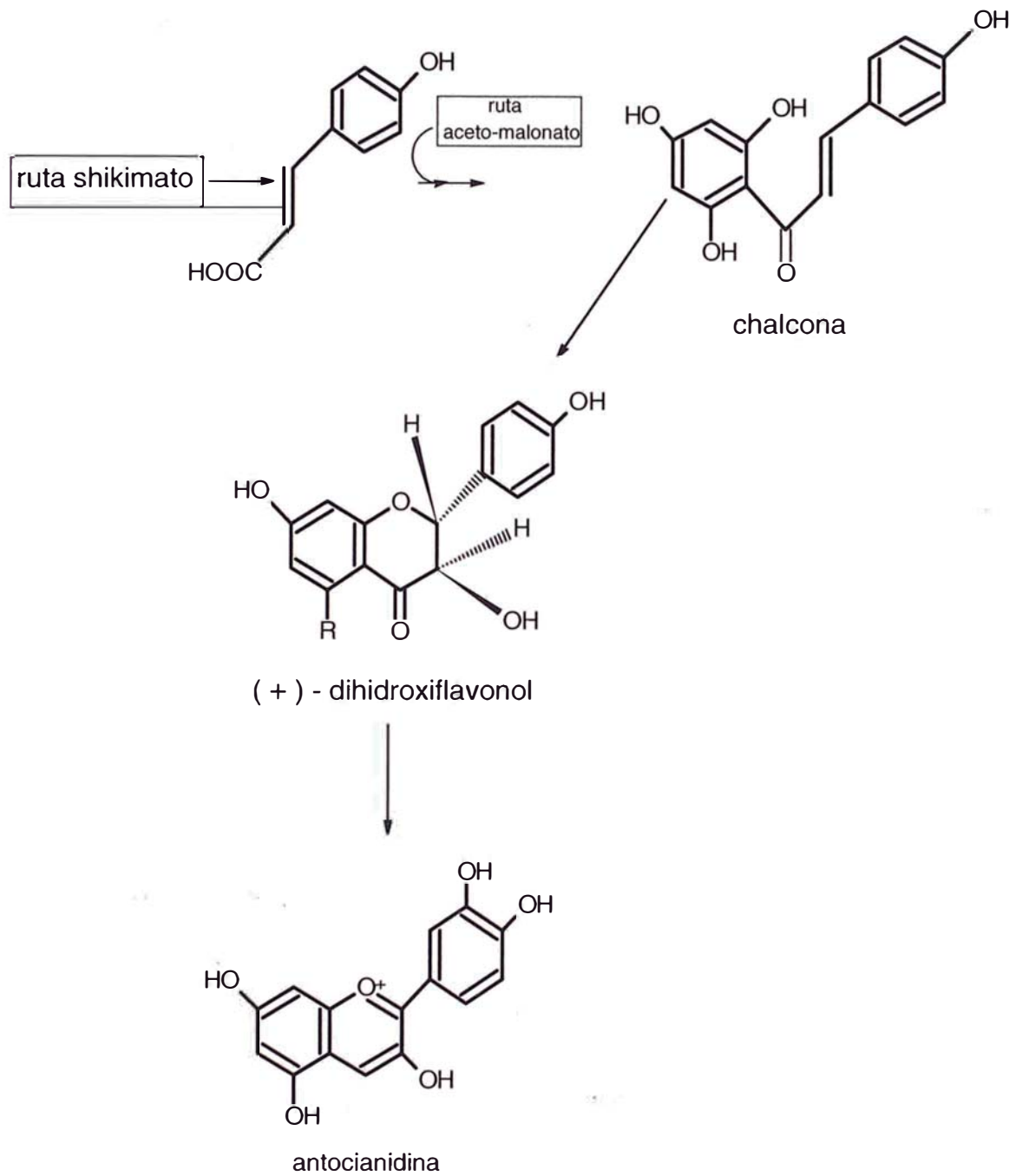


Figura N° 2.9.- Resumen de la biosíntesis de las antocianidinas(105).

5.- Biosíntesis de las antocianinas - glicosidación

No se ha encontrado referencia sobre la glicosidación de las antocianidinas. Sin embargo, como existe una analogía con los flavonoides, precursores en la formación de estos compuestos, desarrollaremos la ruta biosintética para los flavonoides.

Los flavonoides glicosídidos presentes en los cultivos de células en suspensión del perejil consisten de: flavonas 7-O-glucósidos, flavonol 7-O-glucósidos, 7-O-apiosylglucósidos y 3,7-O-diglucósidos, aciladas y no aciladas con grupos malonatos. La secuencia de las etapas enzimáticas implicadas en la formación de la apigenina 7-O-apiosylglucósido malonato a partir de apigenina se muestra en la figura N° 2.10. Todas las enzimas usadas han sido separadas a partir de la planta de perejil.

La primera enzima, UDP-glucosa: Flavonoide-7-O-glicosil transferasa, se mostró que era específico para la posición 7-O de varias flavanonas, flavonas, y flavonoles (pero no para flavonoles-3-O-glicosidadas) como aceptores, mientras que las isoflavonas, cianidina y el ácido *p*-coumárico fueron inactivas. TDP-glucosa puede servir en lugar de la UDP-glucosa como glucosil donador para estos casos.

La UDP-apiosyl : flavonoide-7-O-glucósido apiosyl transferasa (enzima 2, figura N° 2.10) es altamente específica para UDP-D-aposia como donador glicosídico. En contraste, los 7-O-glucósidos de una gran variedad de flavonas, flavanonas, isoflavonas y glucósidos de fenoles *p*-sustituídos pueden servir como aceptores. Sin embargo, no se ha observado reacción con el flavonol 7-O-glucósido.

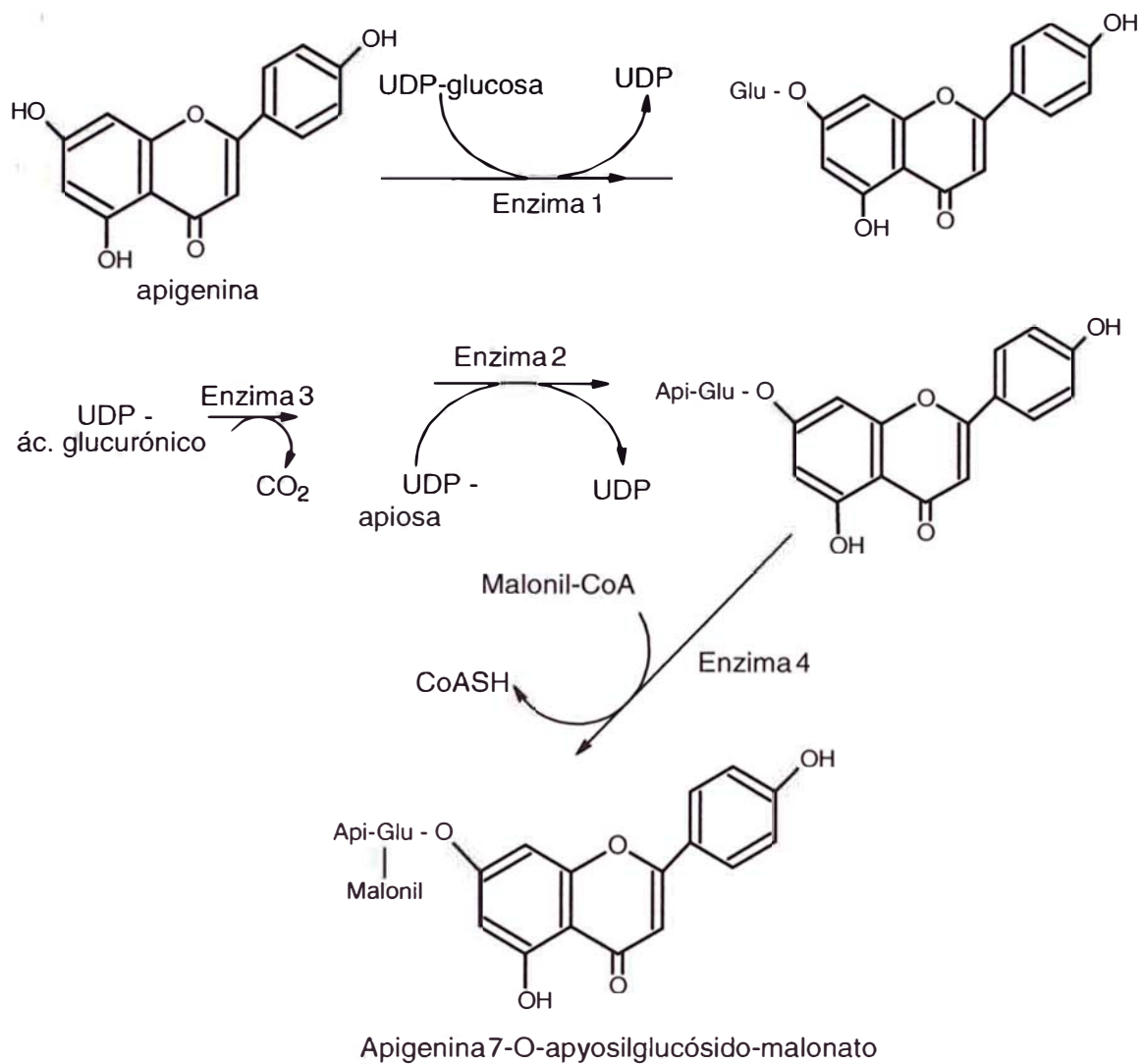


Figura N^o 2.10.- Etapas enzimáticas en la formación de flavonas biósidas aciladas (105).

La probable secuencia enzimática para la formación del flavonol 3,7-O-diglucósido en el sistema del perejil está ilustrado en la figura N^o 2.11. La UDP-glucosa: flavonol-3-O-glucosil transferasa fue aislada y separada completamente a partir de la 7-O-glucosil transferasa mencionada anteriormente. Mientras que el 3-O-glucosil transferasa es específico para la posición de glicosidación de varios flavonoles, incluida la quercetina 7-O-glicósido, quienes puede servir como sustratos.

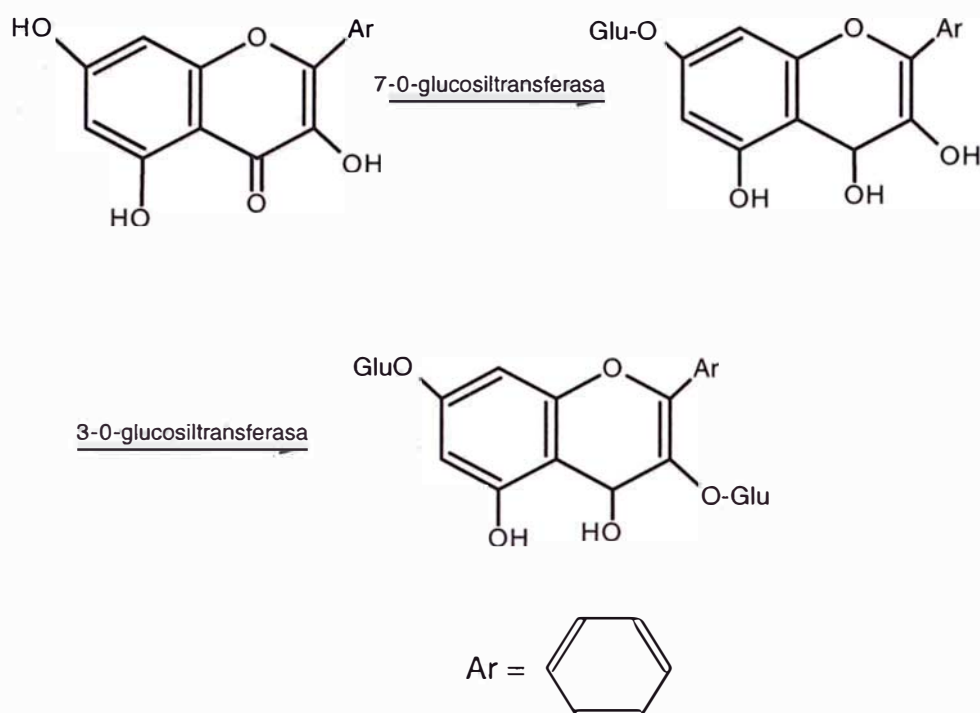


Figura N°2.11.- Secuencia enzimática para la formación de flavonol-3,7-diglucósido(105).

B.- SÍNTESIS QUÍMICA DE ANTOCIANIDINAS Y ANTOCIANINAS

1.- Introducción

En esta sección se revisa diversos reportes de las síntesis de sales de flavilio relacionándolos con el patrón de hidroxilación encontrado en la naturaleza. El énfasis de la discusión se ha centrado en los trabajos recientes, así como en los clásicos.

La estructura de las antocianidinas está caracterizada por la presencia de un anillo **A** derivada del floriglucinol. El anillo **B** formado a partir de la ruta de shikimato puede derivar de cualquiera de los ácidos: gálico, *p*-coumárico, ferúlico-hidroxilados; generando un anillo pirilio deficiente en electrones. Los procedimientos sintéticos esta ordenados sobre la base de varios sintons para el anillo **A** usados en la construcción del sistema heterocíclico. El procedimiento desarrollado por Sir Robert Robinson y colaboradores en la Universidad de

Manchester marcaron un hito en la síntesis de las antocianidinas cuando ellos abrieron el camino a la síntesis de estos glicósidos naturales. Además los trabajos de Bulow en la década del 80 sobre este tema todavía son de importancia actual y proveen un camino simple a la síntesis de las sales de flavilio.

Una alternativa para la síntesis de antocianidinas y antocianinas es la reducción de flavanonas, flavanodíoles o flavonoles. Estas alternativas tienen la ventaja de presentar el anillo cíclico ya construido, teniendo la hidroxilación adecuada en el lugar requerido. La reacción química se lleva a cabo en el anillo heterocíclico para reducir el grupo carbonilo presente en el C-4 y así ajustar los niveles de oxidación para la formación del catión flavilio. Debido a la naturaleza polifenólica de los precursores, el procedimiento para la apropiada protección / desprotección requieren de consideraciones cuidadosas, ambos en términos de compatibilidad y selectividad química.

La supuesta estructura de las antocianidinas pudo comprobarse mediante dos síntesis pioneras en este campo. La más antigua de las dos fue elaborada por **R. Willstätter** y colaboradores (1914) (síntesis de la pelargonidina) y solamente es adecuada para la síntesis de las antocianidinas y el segundo procedimiento se debe a **R. Robinson** que puede utilizarse tanto para la síntesis de las antocianidinas como para las antocianinas, debido a que en el último caso es posible partir de combinaciones previamente glucosidadas.

2.- Síntesis total de antocianidinas y antocianinas

a) *Reacción de Bulow y Wagner* : (44 y 45)

Esta reacción a partir del floroglucinol, procede con buenos rendimientos (90 - 95 %) para $R = CH_3$, $COOH$, *p*-anisol y no es eficiente para $R = H$. El cloruro de flavilio generalmente cristaliza en forma directa fuera de la mezcla de reacción y no se forman regioisómeros para los valores de R señalados anteriormente. En el caso de $R = \text{fenil}$, se observó una mezcla de sales de flavilio, los cuales no se pudieron separar por recristalización fraccionada.

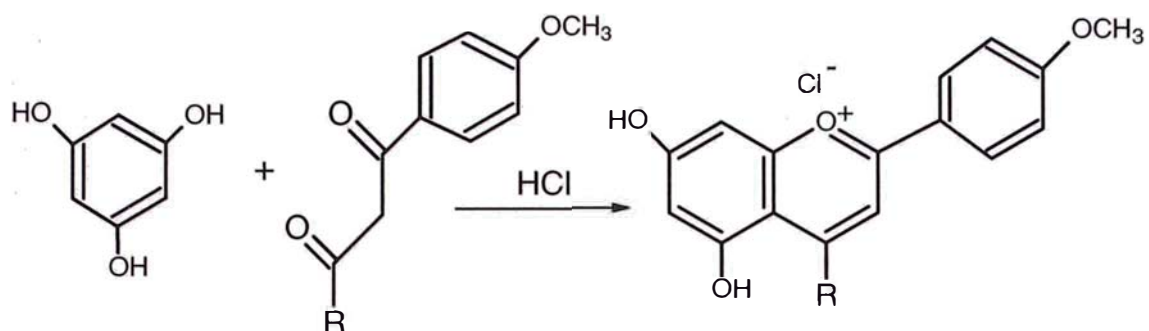
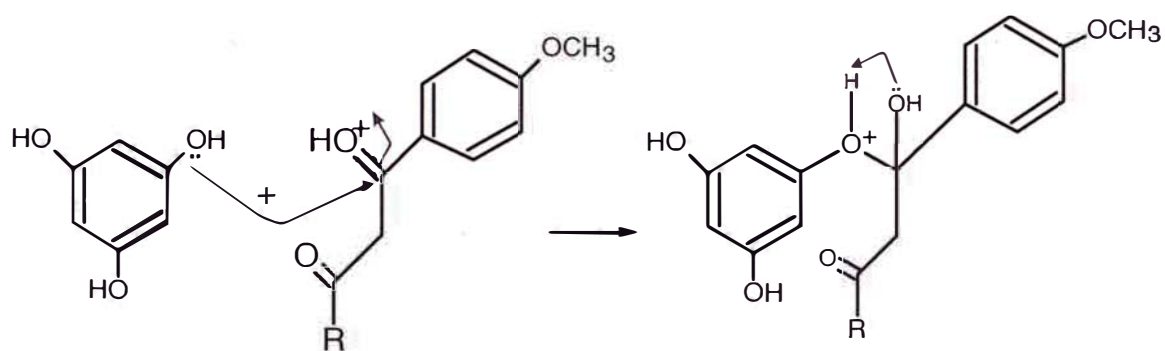


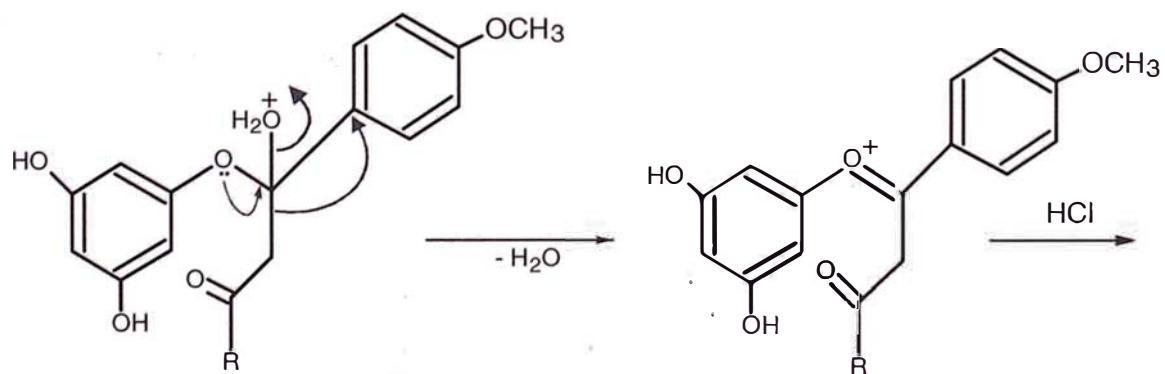
Figura N^o 2.12.- Reacción de Bulow-Wagner para la síntesis de antocianidinas

Mecanismo de reacción :

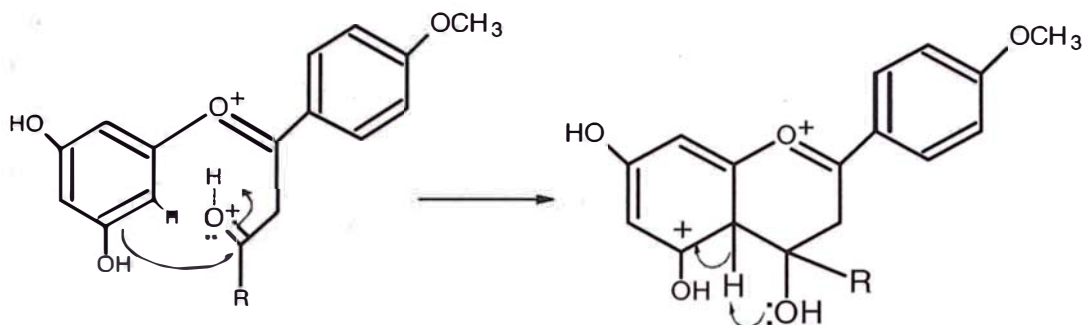
Primer paso: Adición nucleofílica al grupo carbonilo



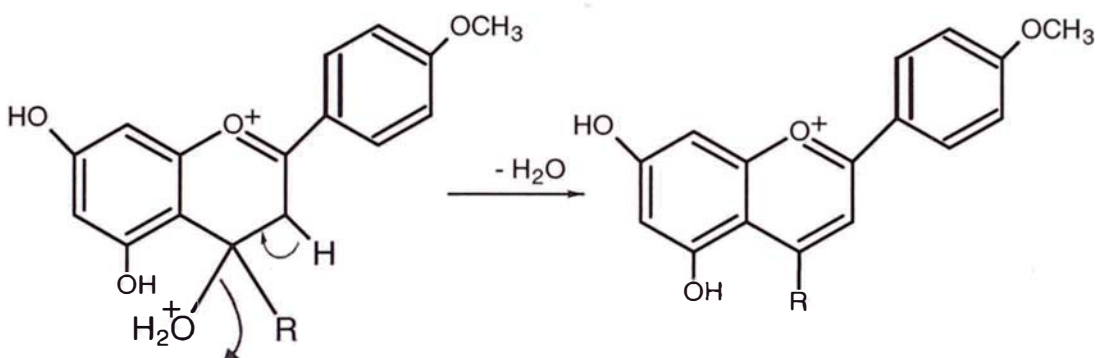
Segundo paso: Deshidratación del hemiacetal



Tercer paso: Ciclación por sustitución electrofílica



Cuarto paso: Formación de la sal de flavilio por deshidratación.



b) Reacción Malkin y Robinson: (46)

Mediante esta reacción se sintetizó el cloruro de 3,4'-O-dimetilpelargonidina. El producto obtenido estaba contaminado con otro regioisómeros que se pudieron separar con dificultad por recristalización fraccionada. Por esta razón, el procedimiento fue abandonado rápidamente por Robinson para comenzar la síntesis a partir de floroglucinaldehido.

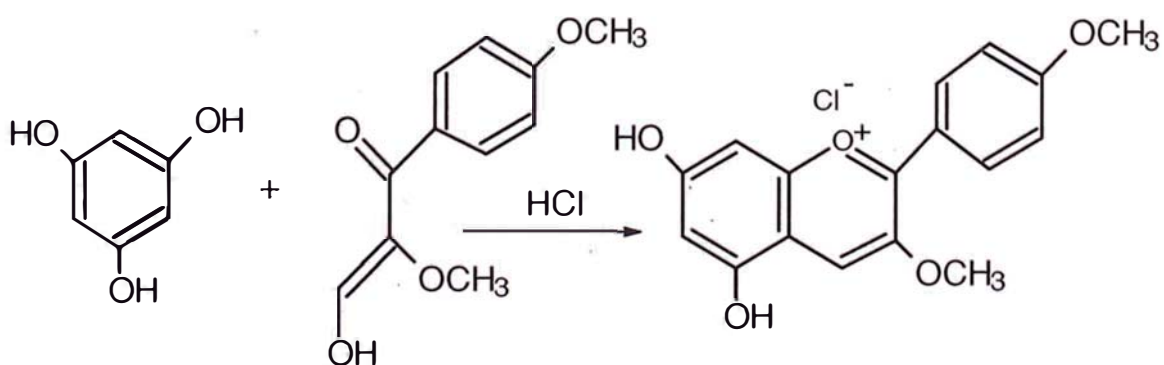


Figura N° 2.13.- Reacción de Malkin-Robinson para la síntesis de antocianidinas

c) **Reacción de Johnson y Melhuish:** (47)

El procedimiento está restringido a la síntesis de 3-desoxiantocianidinas. El ejemplo propuesto a continuación fue reportado con un rendimiento del 37 % y no se indicó la formación de sales, como a menudo sucede en el método **a**. Este método ha sido usado para la síntesis de apigenidina y éteres metílicos de la luteolinidina.

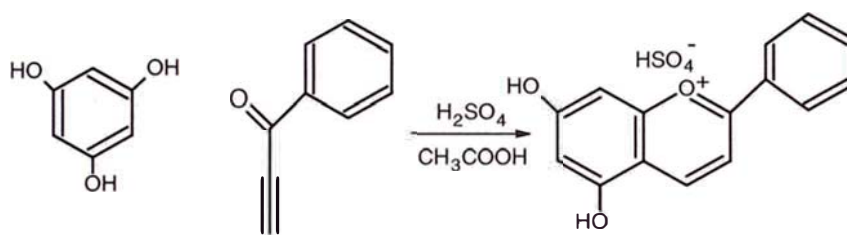


Figura N° 2.14.-Reacción de Johnson y Melhuish para la síntesis de antocianidinas

d) **Método de Sweeny y Iacobucci:** 48

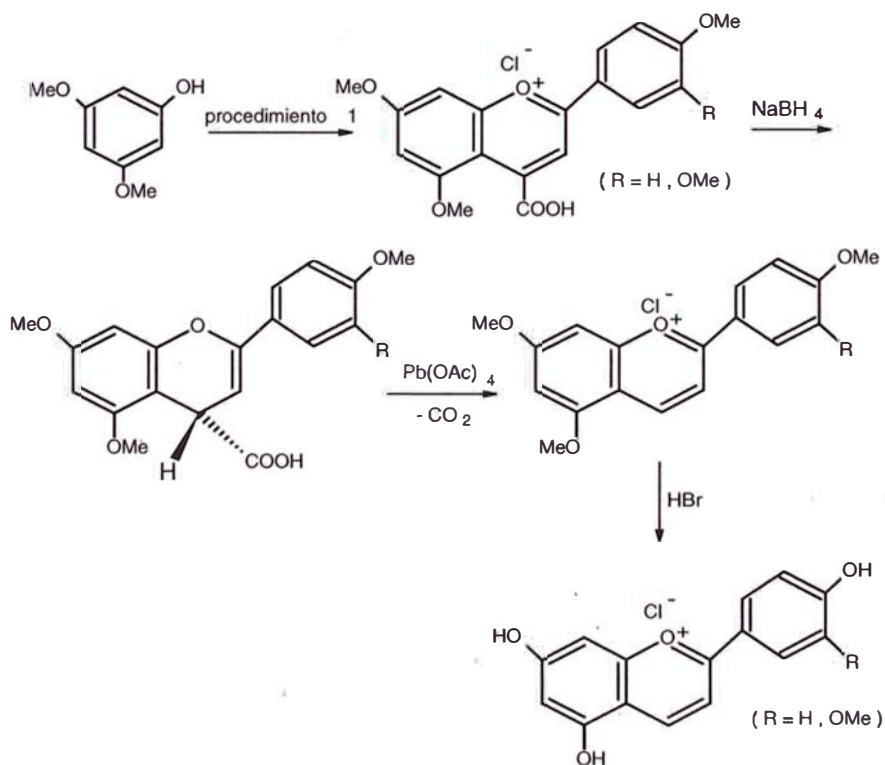


Figura N° 2.15.- Reacción de Sweeny-Iacobucci para la síntesis de antocianidinas

Este procedimiento fue aplicado para la síntesis de cloruros de apigenidina y el cloruro de luteolinidina. Los rendimientos fueron superiores al 50 % cuando se partieron del éter dimetílico de floroglucinol.

e) *Reacción de Willstätter y Zechmeister:* (49 y 50)

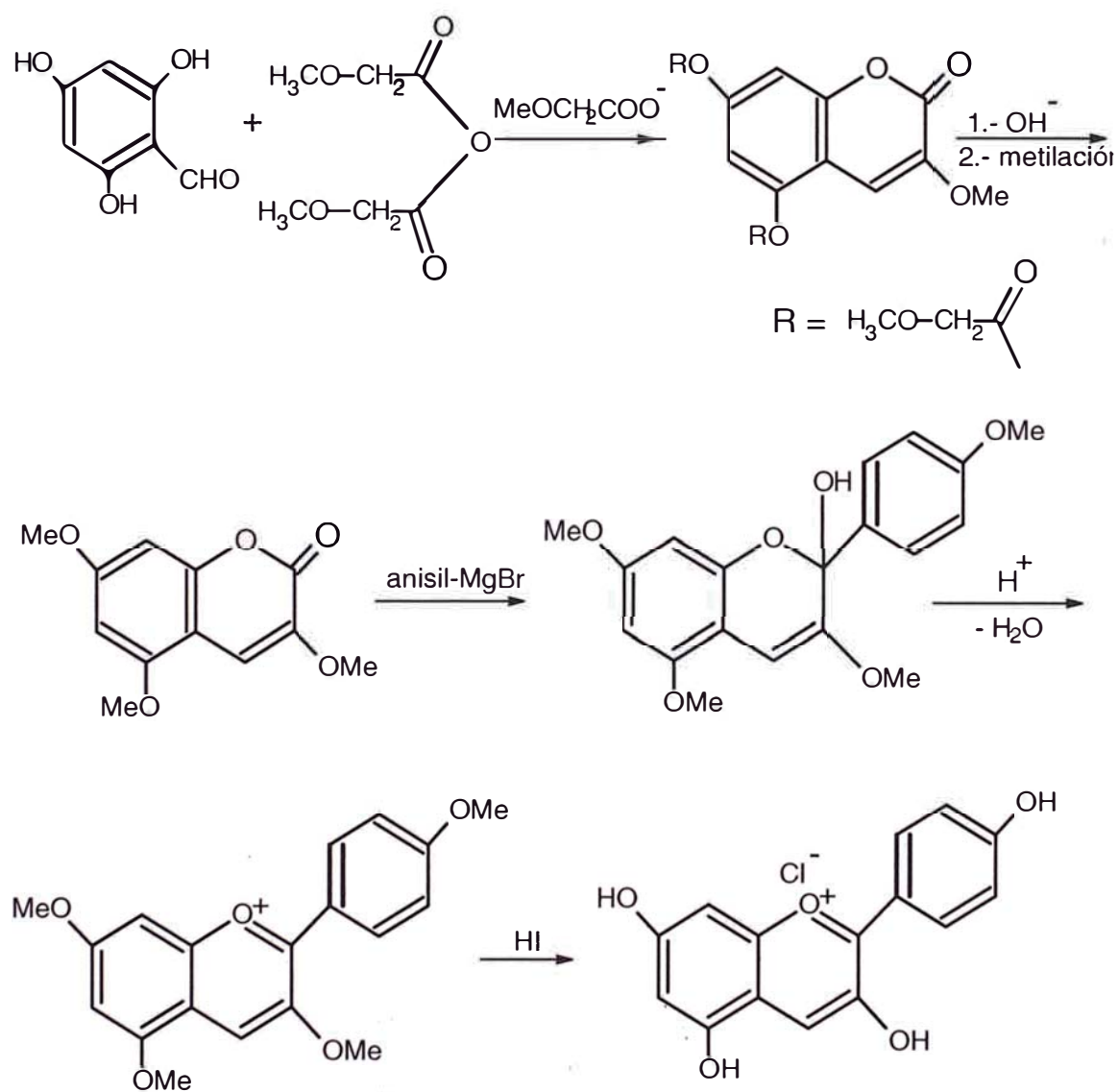


Figura N° 2.16.- Reacción de Willstätter y Zechmeister para la síntesis de antocianidinas

La extensión del uso del reactivo de grignard a una 3-metoxicoumarina fue previamente practicada por Decker y Fellingerg quienes reportaron por primera vez el uso de floroglucinaldehido como sinton para el anillo A. La síntesis del cloruro de pelargonidina ilustrada en el ejemplo representa la primera síntesis de una sal de flavilio natural.

f) Reacción de Pratt y Robinson: (51)

El procedimiento para esta síntesis de antocianidinas fue bosquejado primero por Decker, Perkin y Robinson y después fue intensamente desarrollado por Decker, Fellenberg (52) y Perkin.

La condensación de floroglucinaldehido con acetofenona representa la síntesis clásica de Robinson . Con pequeñas variaciones (procedimiento **g** y **h**) fue usado extensamente por él y sus colaboradores en la Universidad de Manchester para la síntesis de antocianinas naturales.

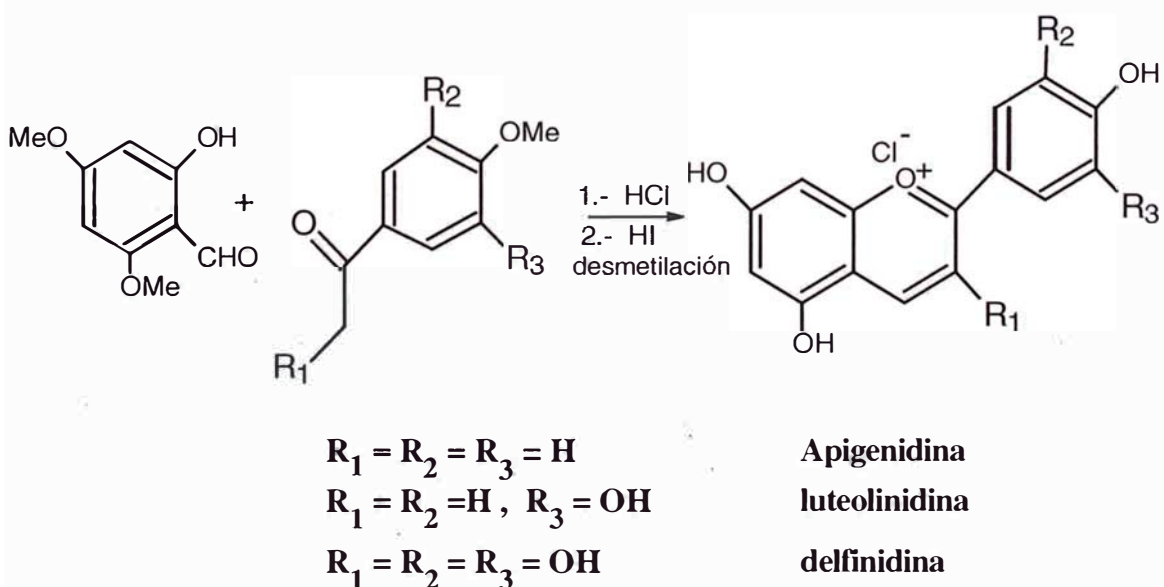


Figura N° 2.17.- Reacción de Pratt y Robinson para la síntesis de antocianidinas

g) *Reacción de Robertson y Robinson: (53 - 56)*

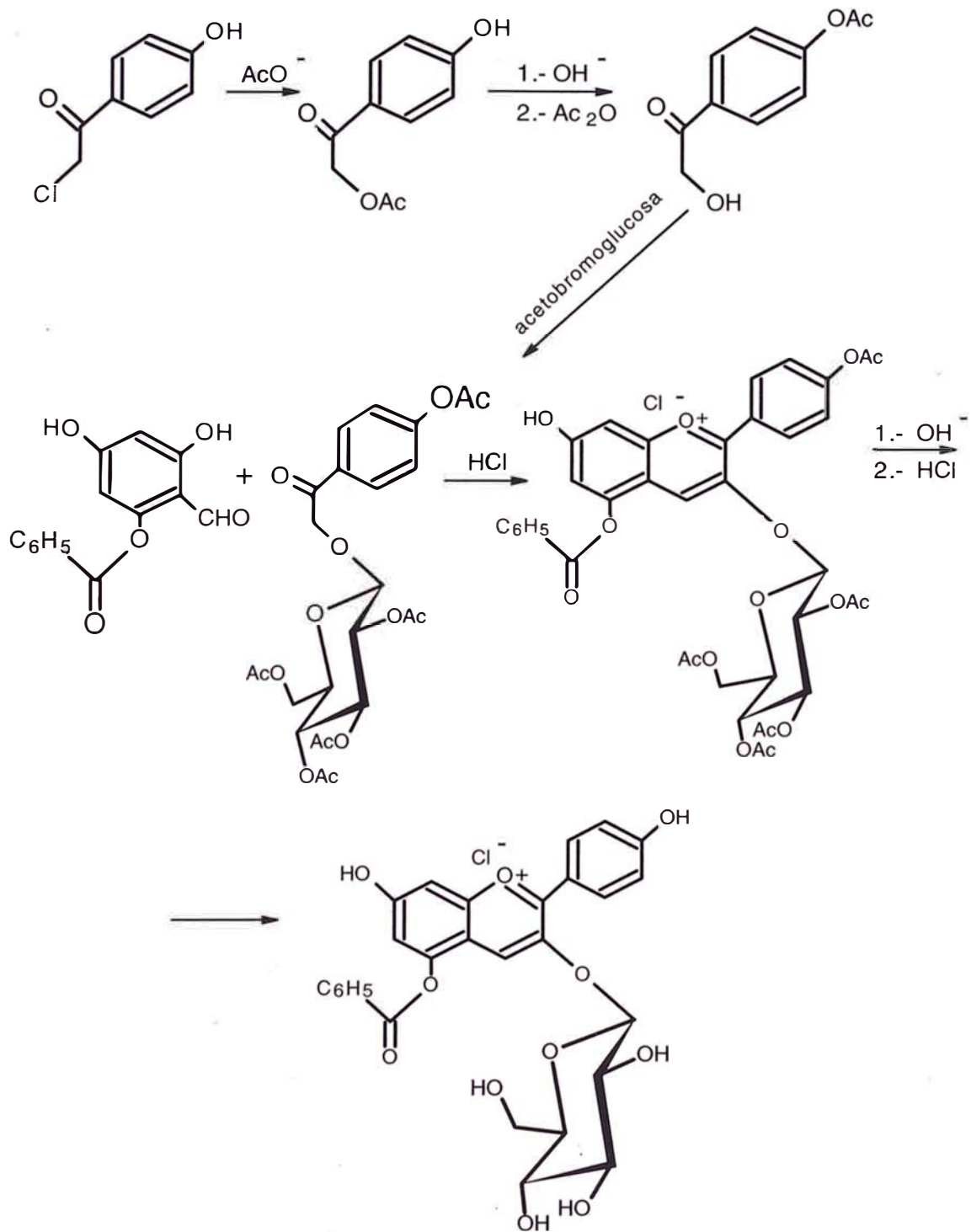


Figura N°2.18.- Reacción de Robertson y Robinson para la síntesis de antocianinas

Esta es la primera síntesis de antocianinas basados en el procedimiento discutido anteriormente, el glucósido fue preparado por el uso de 1- α -bromotetraacetil-D-glucosa. El método general fue diseñado para la síntesis de la perlargonidina 3- β -glucósido. Este trabajo también incluye el uso por primera vez de 2-benzoilfloroglucinaldehído como versión mejorada de este reactivo.

h) Reacción Levy, Posternack y Robinson: (57)

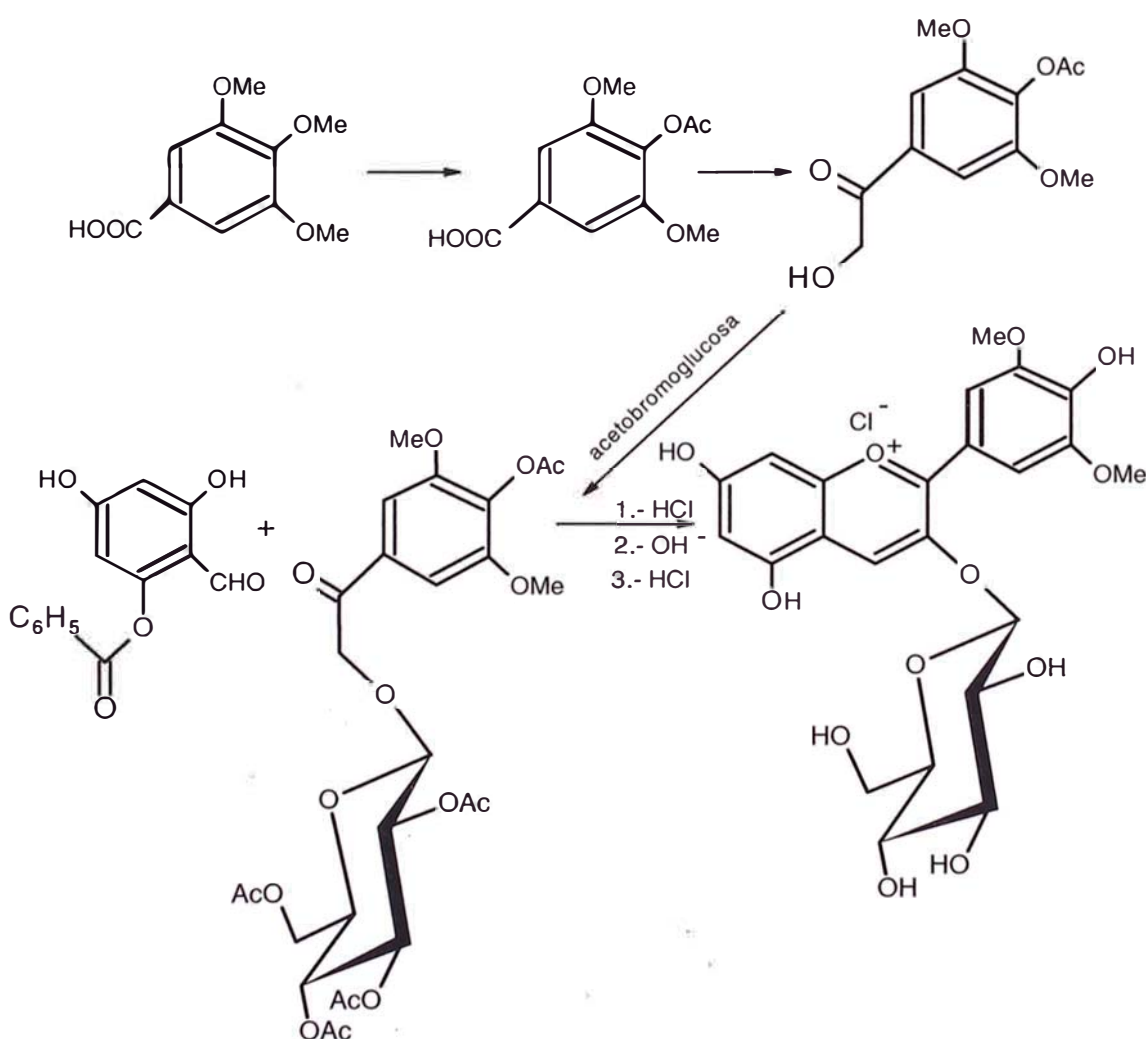


Figura N° 2.19.- Reacción de Levi, Posternack y Robinson para la síntesis de antocianidinas

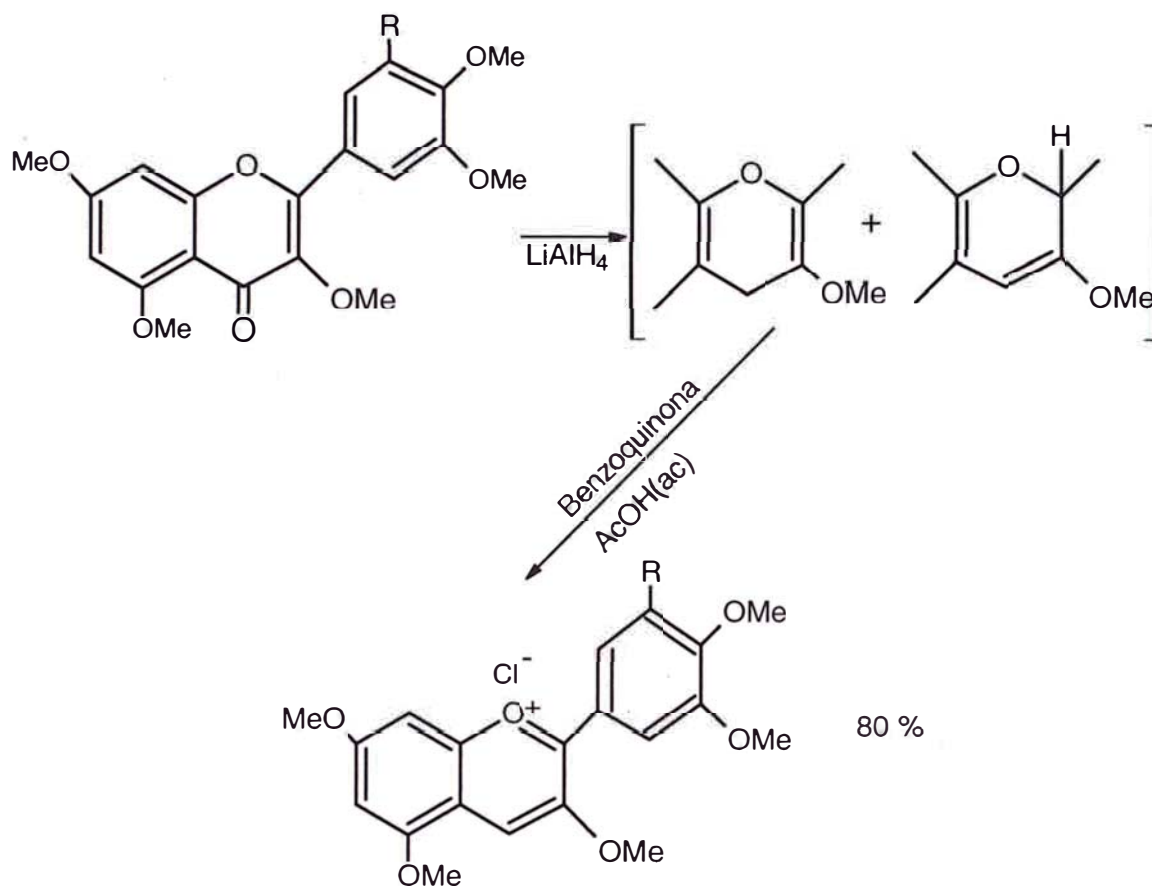
La preparación de cloruro de oenina (malvidin-3- β -glucósido) fue posible por una ampliación del procedimiento mostrado. Para la síntesis de 3,5 - diglicósidos, el 2-benzoilglucinaldehído es remplazado por el 2-O-tetraacetilglucósido. Una evaluación reciente de la síntesis del cloruro de oenina muestra un rendimiento global sobre 0,6 % a partir del éter metílico del ácido gálico.

Este procedimiento permanece como el único camino conocido para la síntesis de antocianinas. La única excepción es el cloruro de keracianina (cianidina-3-rutinósido) el cual se puede obtener por la reducción de la rutina.

3.- Síntesis de antocianidinas y antocianinas por conversiones químicas de precursores flavonoides

a) *Reacción de Jurd:* (58 , 59)

Se preparó una mezcla de flavenos por reducción de éteres metílicos de flavonoles con LiAlH_4 , como se ha descrito previamente. El uso benzoquinona para la oxidación de flavenos fue introducido por Jurd, quién reportó rendimientos del 80 %. La reducción con LiAlH_4 se uso anteriormente en el trabajo de Mirza y Robinson y también se usó benzoquinona en las investigaciones de Robinson y Walker (60).



R = H : cloruro de cinanidina pentametilado

R = OCH_3 : cloruro de delphinidina hexametilado

Figura N° 2.20.- Reacción de Jurd para la síntesis de antocianidinas

b) Reacción de Clark - Lewis y Jemison: (61)

Aunque este procedimiento sólo es aplicable a las 2'-hidroxichalconas naturales. El procedimiento toma ventajas respecto a las chalconas preparadas por condensación de la *o*-hidroxiacetofenona a partir de benzaldehidos sustituidos.

La ciclación reductiva introducida por Clark-Lewis dió 3-flavenos con un rendimiento de 60-80%. El paso de deshidrogenación se lleva a cabo de acuerdo al método de Jurd, anteriormente mencionada.

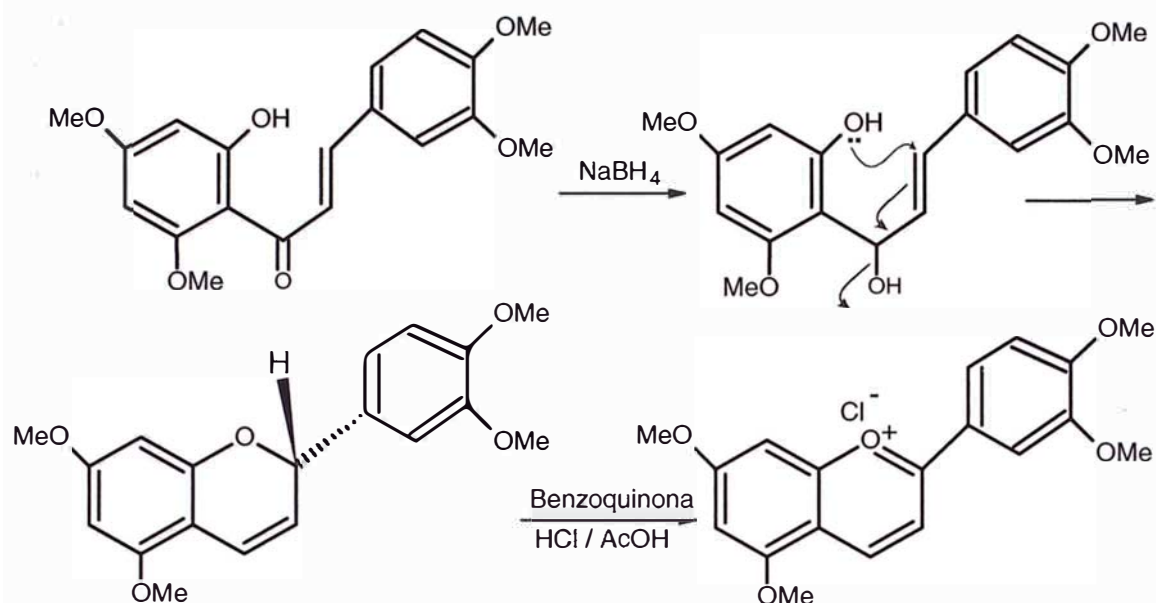
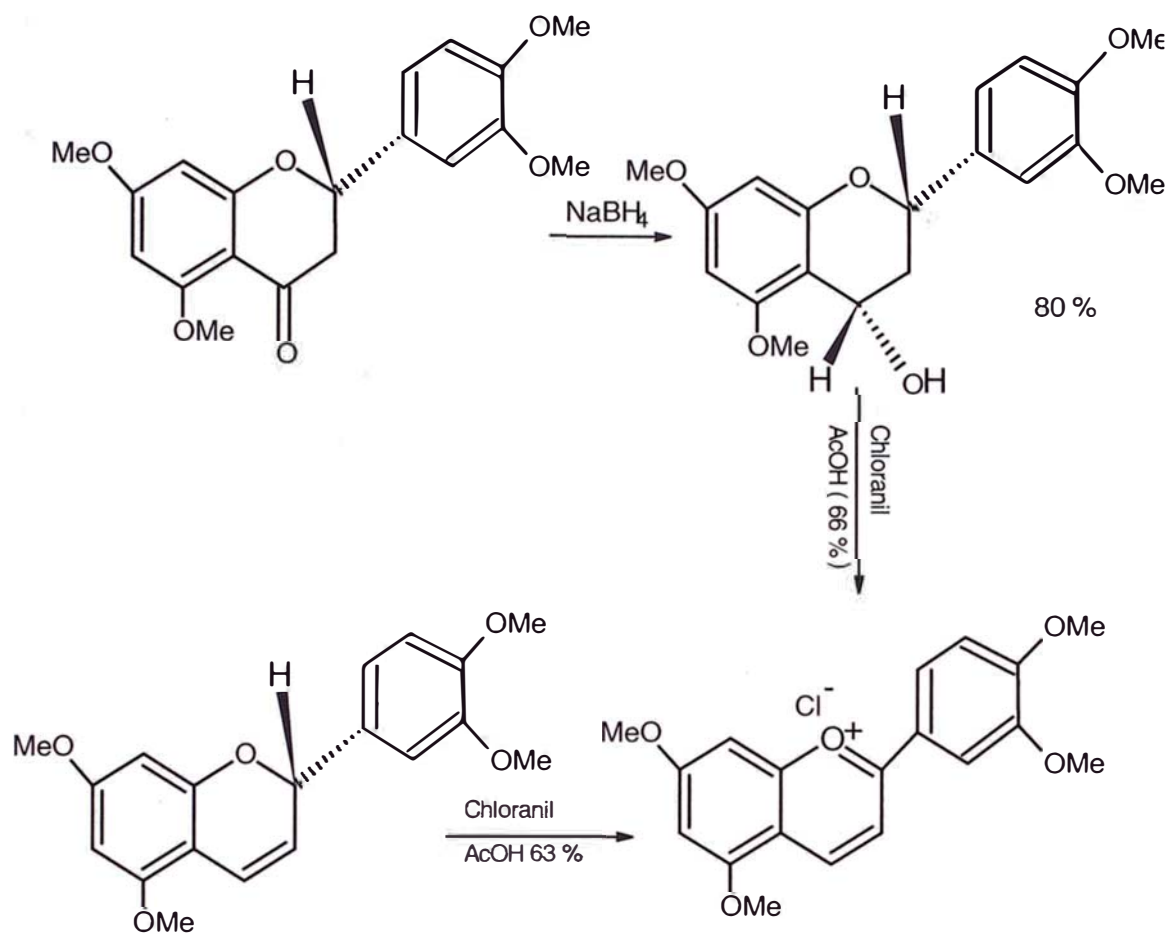


Figura N°2.21.-Reacción de Clark-Lewis y Jemison para la síntesis antocianidinas

c) *Reacción de Sweeny y Iacobucci:* (62)

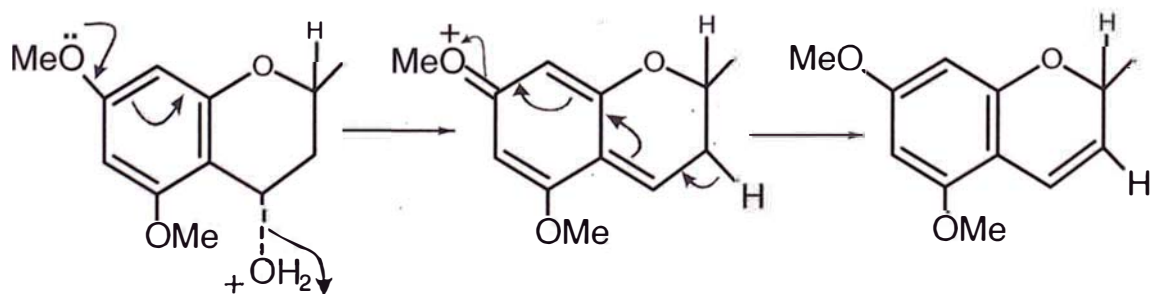
La 4-hidroxi-3',4',5,7-metoxiflavana fue preparado partiendo de 3',4',5,7-tetra-O-metileriodictol por procedimientos conocidos. La oxidación con chloranil, tetracloro-*p*-benzoquinona, procede a través de un flaveno intermedio. Los rendimientos de antocianidina con el chloranil (60-70 %) son mejores que aquellos que se obtienen con la bezoquinona (20-40 %) y la etapa de deshidratación requiere de un oxígeno sustituyente en C-7. La apigenidina trimetiléter y luteolinidina tetrametiléter fueron preparados por este procedimiento.



A partir del procedimiento b

Figura N° 2.22.-Reacción de Sweeny y Iacobucci para la síntesis de antocianidina

Mecanismo de la deshidratación:



d) Reacción de Sweeny y Iacobucci: (62)

La reducción utilizando NaBH_4 de la taxifolina-3, 3', 4', 5, 7-pentametiléter dió la pentametil-3,4-flavanadiol. La oxidación con chloranil a cloruro de pentametilcianidina requiere la adición de HCl para la facilitar la deshidratación del intermediario 3-flaveno. El producto fue idéntico al preparado a partir de la pentametilquercetina usando el procedimiento **a**.

Los rendimientos a partir de la oxidación del chloranil en este caso fueron bajos que los observados en la oxidación de 4-flavanol (procedimiento **c**) y de la oxidación de la benzoquinona de la 3', 4', 5, 7-tetrametoxi-3, 4-dihydroxiflavona.

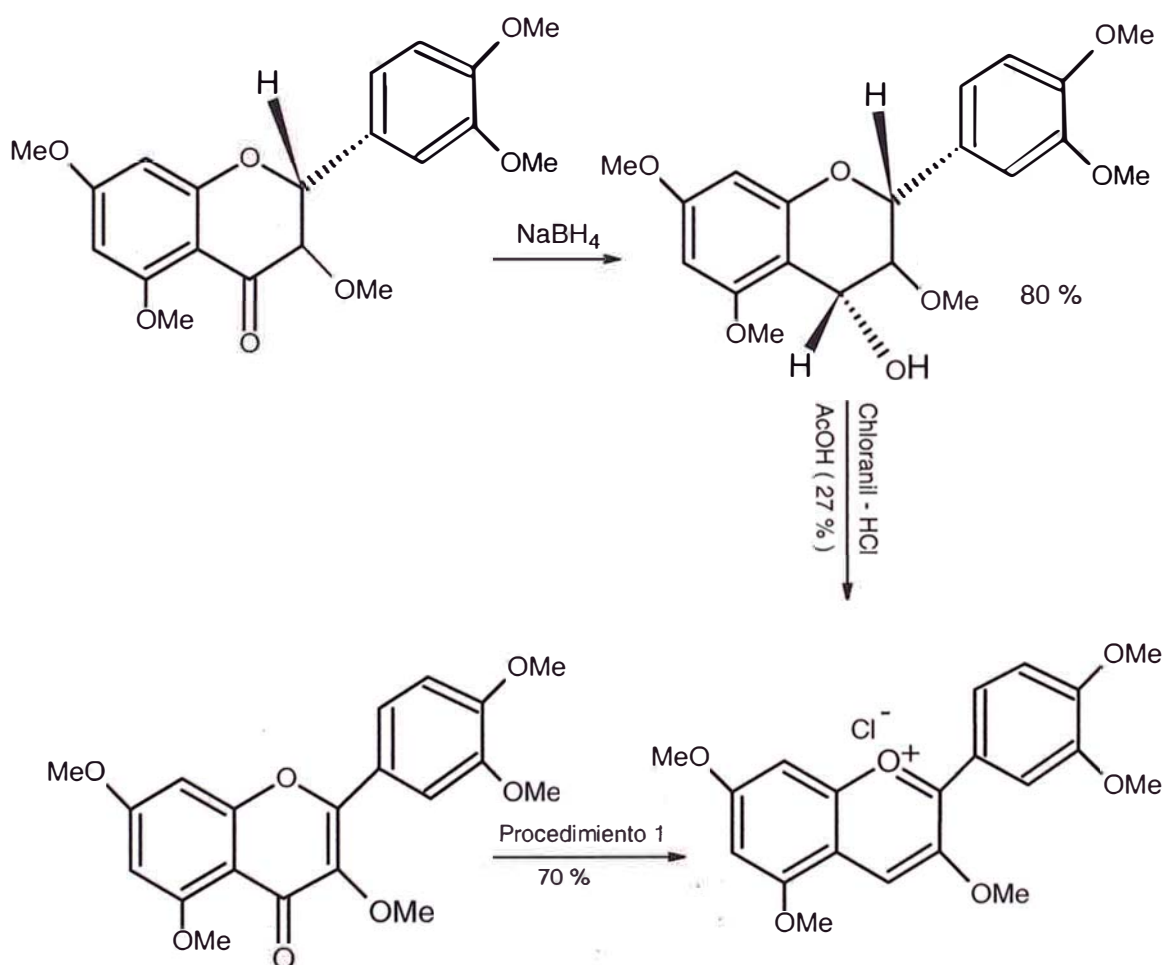


Figura N° 2.23.-Reacción de Sweeny y Iacobucci para la síntesis de antocianidinas

e) **Reacción de Bauer:** (75)

Esta reacción ha sido cuidadosamente re-examinada recientemente. El rendimiento de la keracianina después de la cromatografía sobre Polyclar A.T. fue sólo entre 8 - 10 %. La misma reducción condujo sobre el hexaacetato de 3',4',5,7-O-tetrametilrutina, sin embargo, dio cloruro de tetrametil de keracianina con un rendimiento de 35 %. Como el intermediario 3-flaven-4-ol es fácilmente reducible a 2-flaveno por el borohidruro de sodio (ver procedimiento **a**), el rendimiento observado de antocianinas debe resultar del efecto protector del disacárido voluminoso en C3, previniendo reducciones posteriores del intermediario alcohol vinílico.

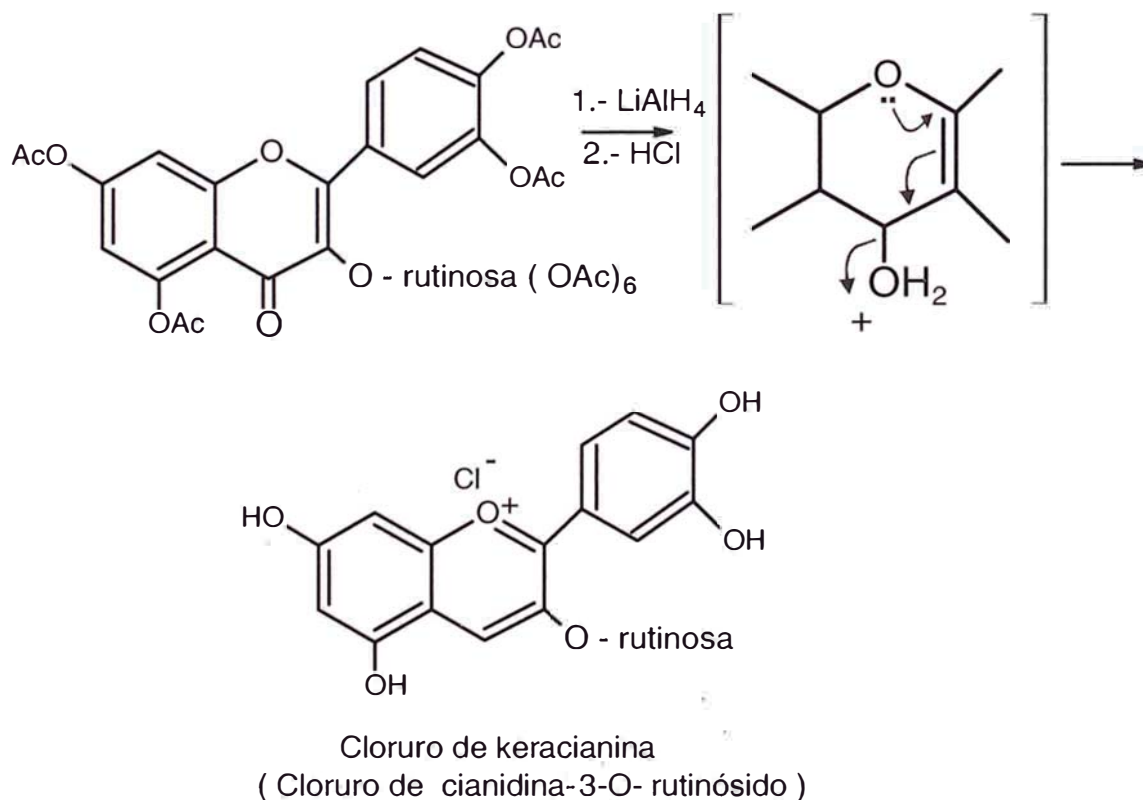


Figura N^o 2.24.- Reacción de Bauer para la síntesis de antocianinas

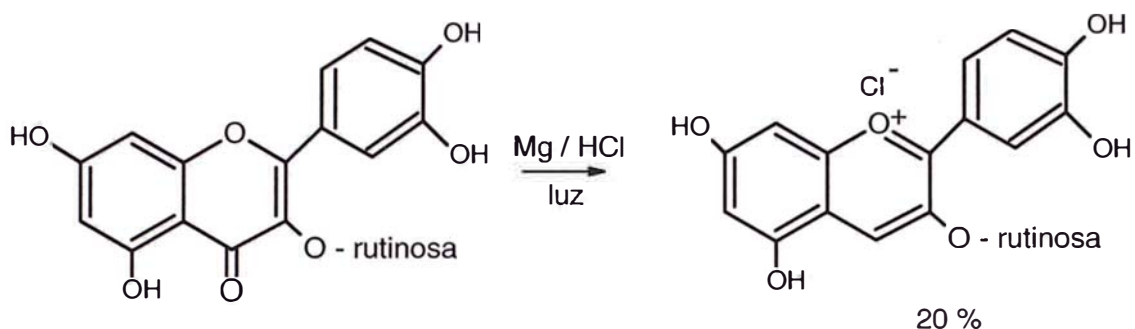
f) **Reacción de Walkihira:**(124)

Figura N° 2.25.- Reacción de Walkihira para la síntesis de antocianidinas

El éxito de este método parece residir en la irradiación con luz ultravioleta a la mezcla de reacción mientras esta procede. El rendimiento del cloruro de keracianina fue del 20 %, pero sólo del 5 % en ausencia de la irradiación.

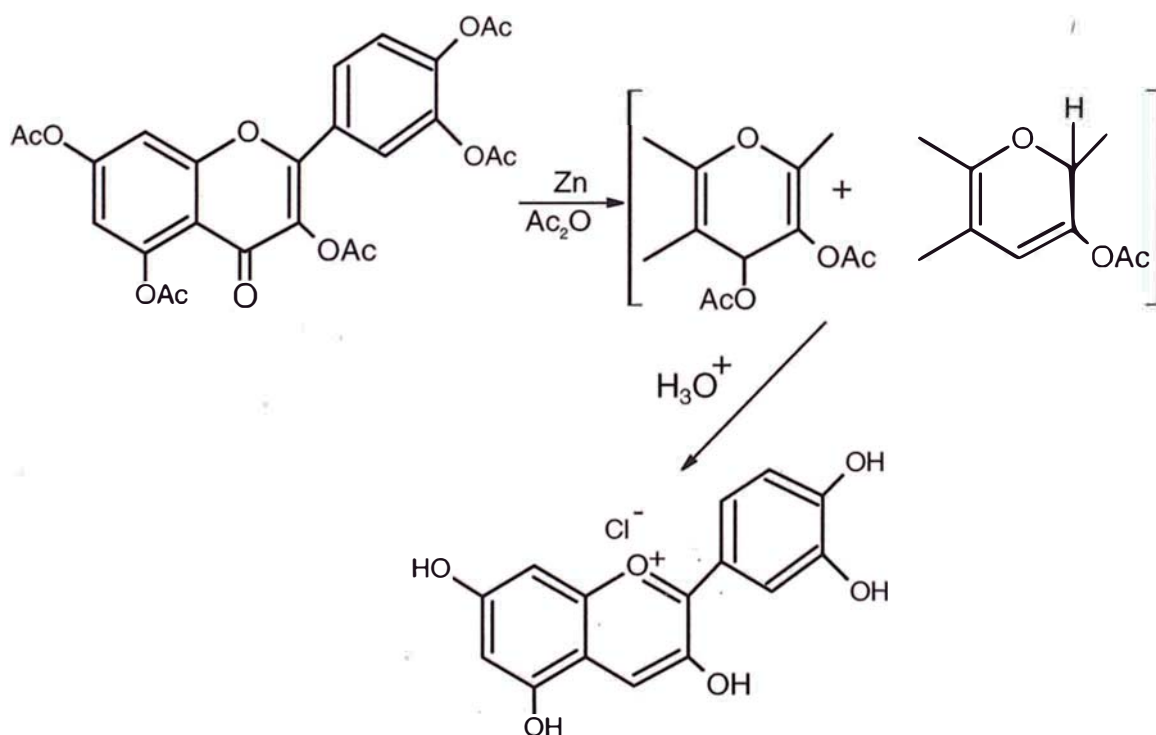
g) **Reacción de Robertson y Robinson:** (54)

Figura N° 2.26.-Reacción de Robertson y Robinson para la síntesis antocianidinas

Estos experimentos pioneros sobre la acetilación reductiva de los flavonoles produce antocianidinas con bajos rendimientos. Este procedimiento fue desarrollado sobre la base de las observaciones originales de Willstätter sobre la reducción de la quercetina con magnesio y cinc en polvo y HCl en metanol (ver el procedimiento **f** anterior) para el cloruro de cianidina.

4.- Síntesis de sales de flavilio relacionados con las antocianidinas

a) *Reacción de Bulow:* (44, 45)

Se extiende el procedimiento **a** de **2** para el resorcinol, descrito inicialmente para la floroglucinol.

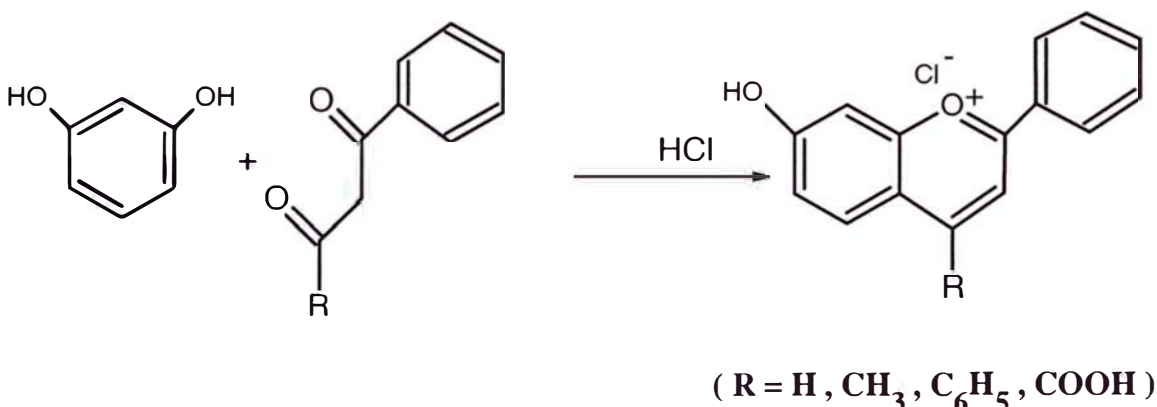


Figura N° 2.27.- Reacción de Bulow para la síntesis de antocianidinas

El Benzoinacetaldehido (R = H) da cloruro de 7-hidroxi-4-flavilio con el resorcinol fracasando con el floroglucinol. Timberlake utilizó esta reacción para la síntesis del cloruro de 7-hidroxi-4-metil y 7-hidroxi-4-*p*-anisilflavilio con diferentes hidroxilaciones para el anillo **B**.

b) *Reacción de Johnson y Melhuis:* (47)

Este procedimiento ya discutido para el floroglucinol, procedimiento **c** de **2** puede ser extendido para el resorcinol u otro reactivo fenólico.

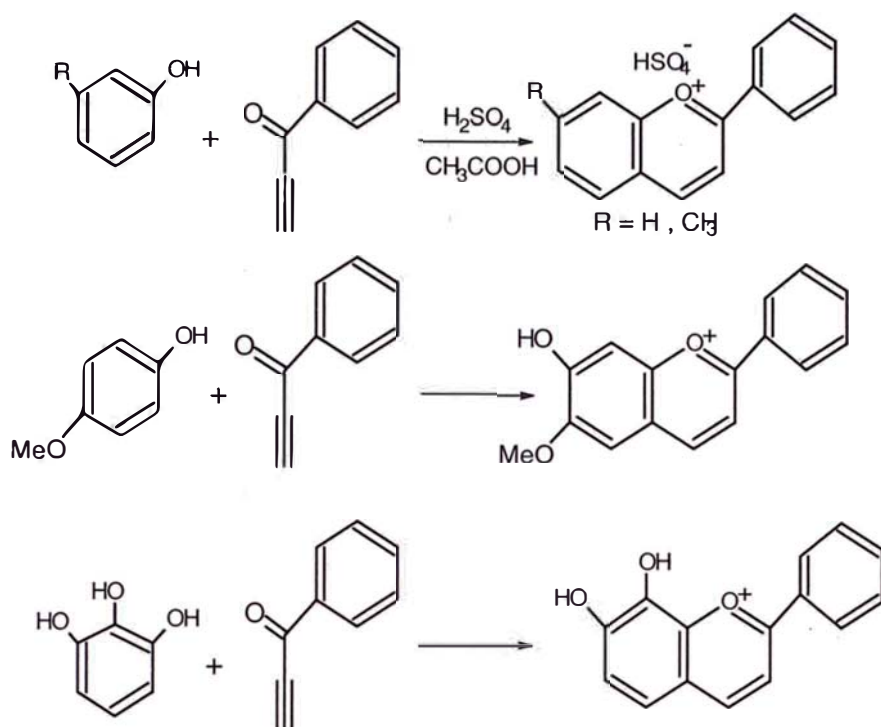


Figura N° 2.28.- Reacción de Johnson y Melhuus para la síntesis de antocianidinas

c) *Reacción de Perkin y Robinson:* (51)

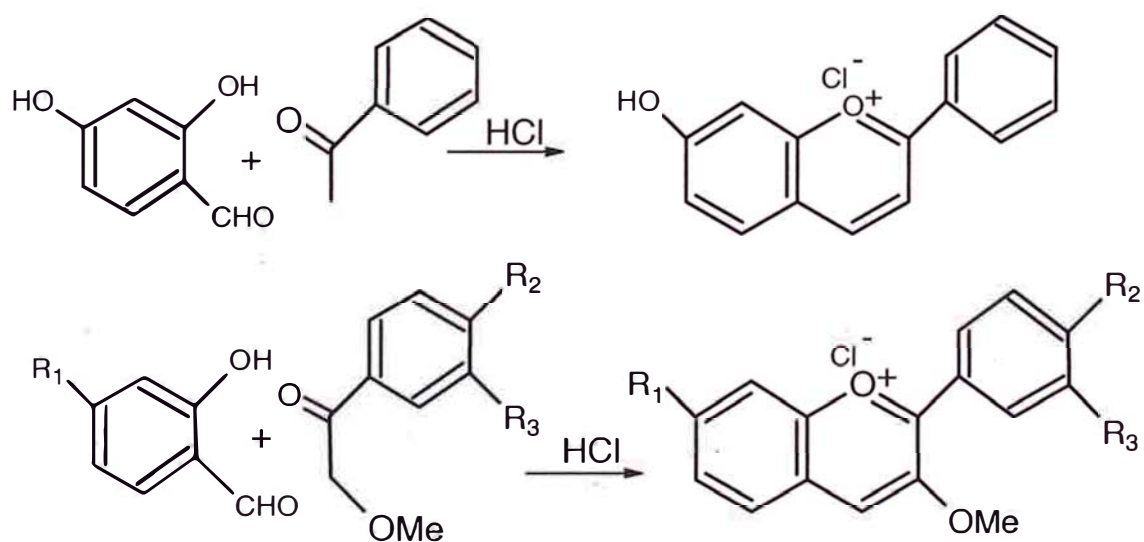


Figura N° 2.29.- Reacción de Perkin y Robinson para la síntesis de antocianidinas

Esta es la primera preparación con éxito de las sales de flavilio por la condensación de la acetofenona con el 2-hidroxibenzaldehído, seguido de la ciclización por catálisis ácida de la chalcona. Este modelo simple de reacción abrió el camino definitivo, a las investigaciones de Pratt y Robinson para la síntesis de antocianidinas (ver 2, procedimiento f) y las de Jurd para la preparación de una familia de sales de 7-hidroxi flavilios, investigados como potenciales colorantes de alimentos.

d) *Goswami y Chakravarti:* (65 , 66)

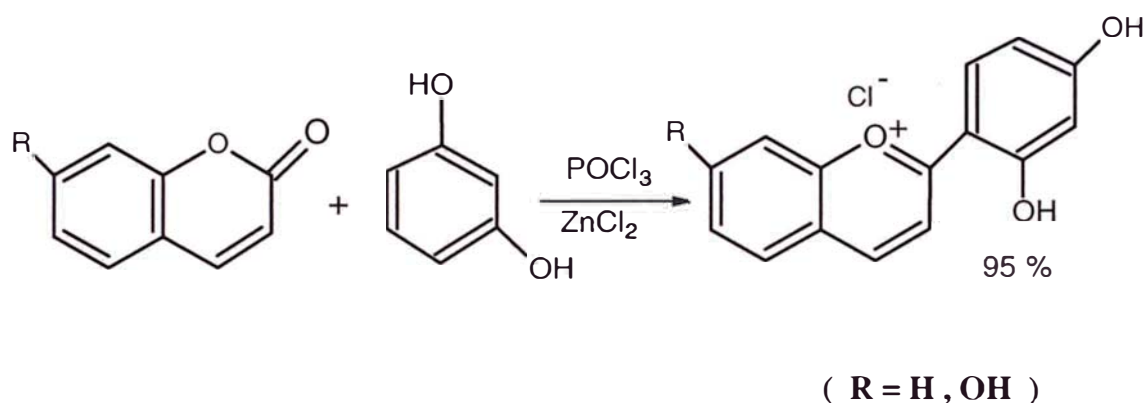


Figura N° 2.30.- Reacción de Goswami y Chakravarti para la síntesis de antocianidinas partiendo de coumarinas

Este método es una variación del procedimiento original de Deckery y Fellenger sobre la 2-fenilación de la coumarina usando reactivo de Grignard (ver 2, procedimiento e). Este método procede con buenos rendimientos y es adecuado para la preparación de sales de flavilio usando sustituciones inusuales en el anillo B, comenzando a partir de coumarina disponible y de 7-hidroxioumarina. La reacción entre coumarina y flororglucinol fue reportado por Jurd y procede sólo con un rendimiento del 20 %.

e) *Reacción Mercier y colaboradores:* (67)

Este procedimiento fue practicado satisfactoriamente con las 3-benzoilcoumarinas indicadas. La reacción involucra la hidrólisis de la lactona, descarboxilación del ácido cinámico

intermediario y la ciclación de la 2-hidroxicalcona formada para dar la sal de flavilio.

Las 3-benzoylcoumarinas son accesibles a partir de la condensación catalizada por ácidos del salicilaldehído con el benzoato de etilo. De hecho, ningún producto natural ha sido preparado de esta manera.

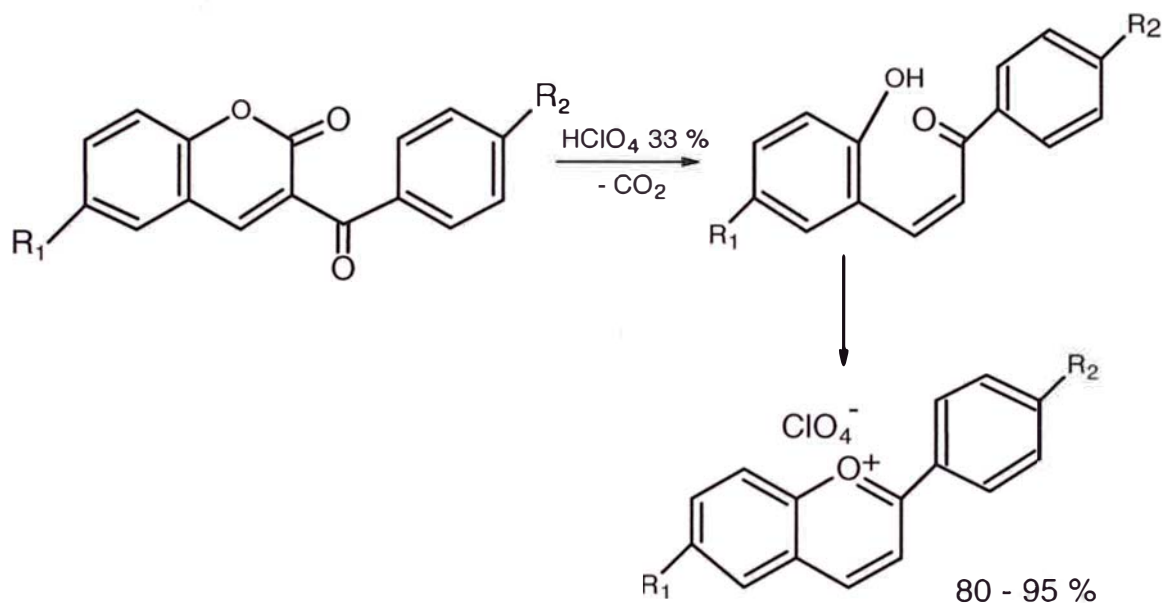


Figura N° 2.31.- Reacción de Mercier para la síntesis de antocianidinas partiendo de derivados de la coumarina

f) *Ciclación oxidativa de la chalcona y 2,4,4'-trimetoxichalcona a sales de flavilio:*

(68)

Ambas reacciones han sido reportadas por Brown et al.. La reacción (i) podría ser considerada como la apertura concertada de un epóxido, seguido de la deshidrogenación para dar el flavilio.

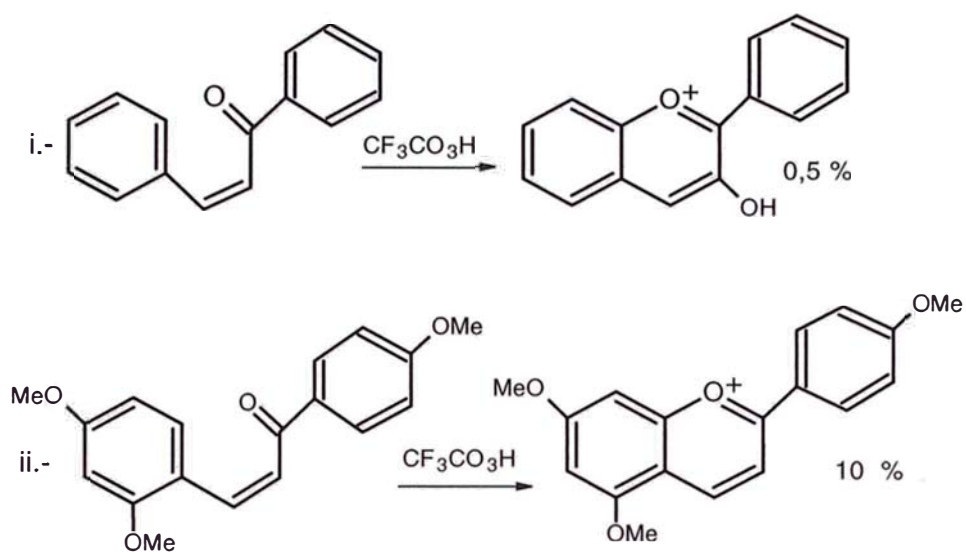
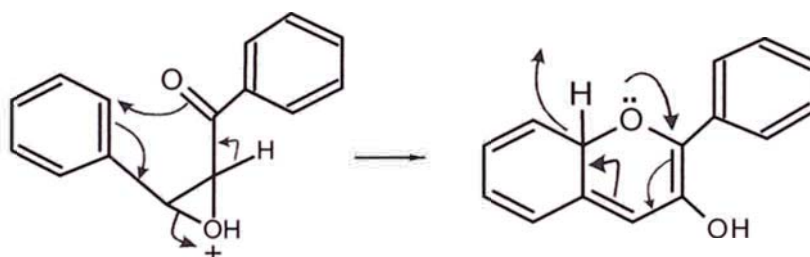
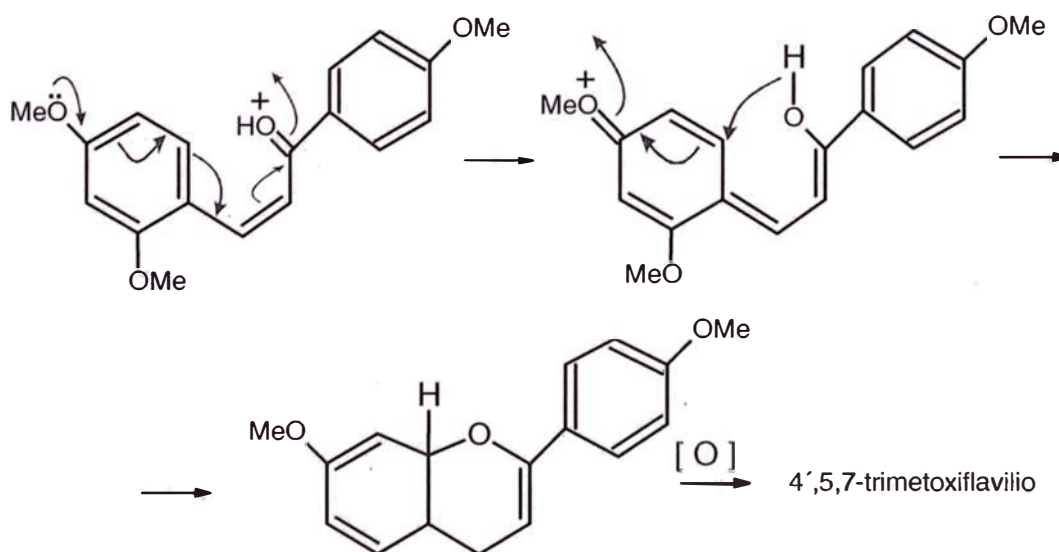


Figura N° 2.32.- Síntesis de antocianidinas por ciclación oxidativa de la chalcona

Mecanismo de ciclación oxidativa de la chalcona:



La reacción (ii) sigue un curso diferente, quizá bajo la influencia de grupo 4-OMe.



C.- QUÍMICA DE LAS ANTOCIANINAS

1.- Química de las soluciones acuosas de las sales de flavilio

a) Efecto de los cambios de pH

Las antocianinas son notoriamente inestables bajo condiciones neutras y/o básicas. El efecto de incrementar el pH sobre la estructura de una antocianina fue investigado por primera vez en los 60 por Jurd (69, 70), Timberlake y Bridle (71) y Harper y Chandler (72, 73), pero no fue hasta las investigaciones de Brouillard (74) después de los 70, que usando técnicas de variaciones diferenciales de pH pudo efectuar transformaciones estructurales en las antocianinas en función del pH quedando aclarando la estructura de las mismas.

A $\text{pH} < 2$, la antocianinas existen principalmente como cationes flavilios (AH^+) de color rojo ($\text{R}_1 = \text{O-azúcar}$) o de color amarillo ($\text{R}_1 = \text{H}$). Cuando el pH se incrementa rápidamente, se produce la pérdida de un protón para dar la forma quinoidal **A** de color rojo o azul (Figura N° 2.33). La forma quinoidal generalmente existe como una mezcla ya que el pKa de los grupos 4',7(si están presentes) y el 5-OH son muy similares. En estas condiciones, ocurre además la reacción de hidratación del catión flavilio (AH^+) para dar el cromenol **B**, incoloro. Esta reacción ocurre lentamente, equilibrándose con la forma **C**, la chalcona, la cual también es incolora.

Una reacción adicional para el cromenol, es el ataque por el agua en la posición C-4 para dar el 2-cromen-4-ol. McClelland y Gedge (76) han mostrado que aunque el ataque nucleofílico en la posición 4 de un catión flavilio no sustituido en la posición 5 es el producto cinético de acuerdo a la teoría de los orbitales moleculares, mientras que, el producto termodinámico es el 2-cromenol, por un factor de por lo menos 100.

Las cantidades relativas del catión (AH^+), forma quinoidal **A**, cromenol **B** y la chalcona **C** en el equilibrio varía con el pH y con la estructura de la antocianina. Para las antocianinas comunes 3-O-glicósidos ó 3,5-diglicósidos, el producto principal formado cuando el pH se incrementa por encima de 3 es el cromenol **B** incoloro como se muestra en la Figura N° 2.34, para el malvidin-3-glucósido.

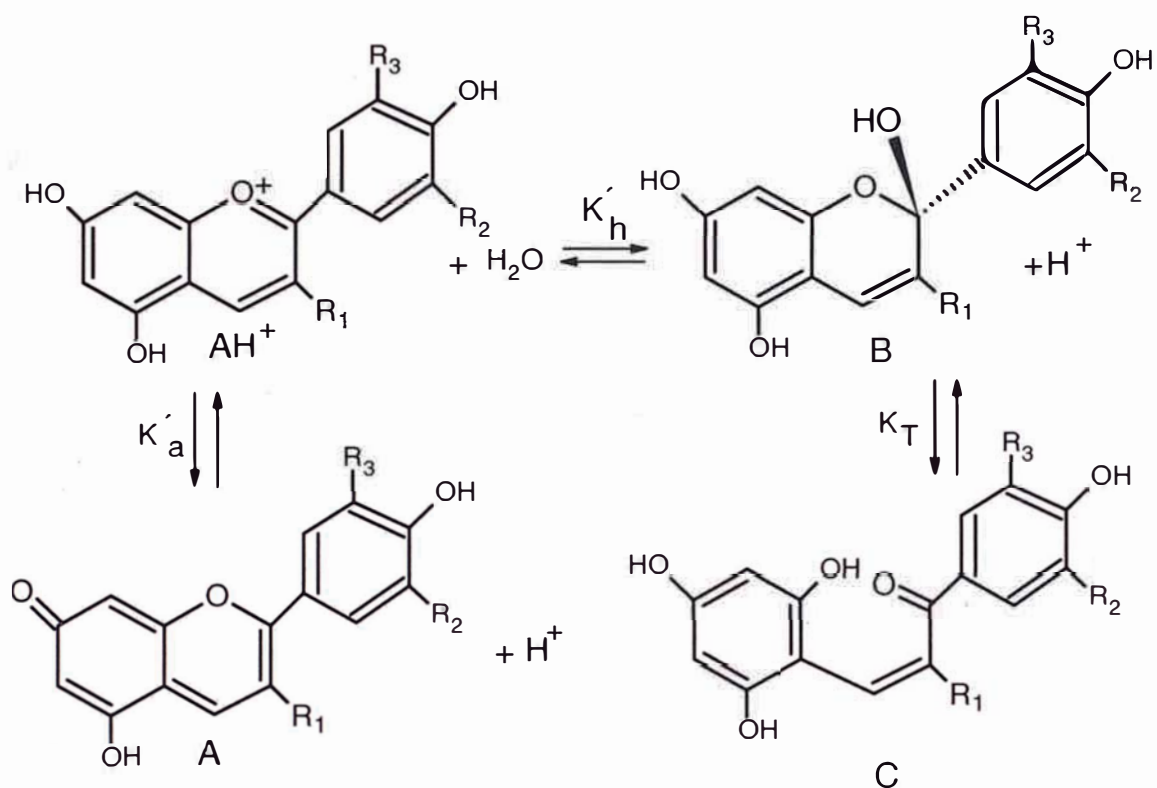


Figura N° 2.33.- Equilibrios ácido - base en función del pH. AH^+ : cationes flavílicos, A: forma quinoidal, B: cromenol y C: chalcona(48).

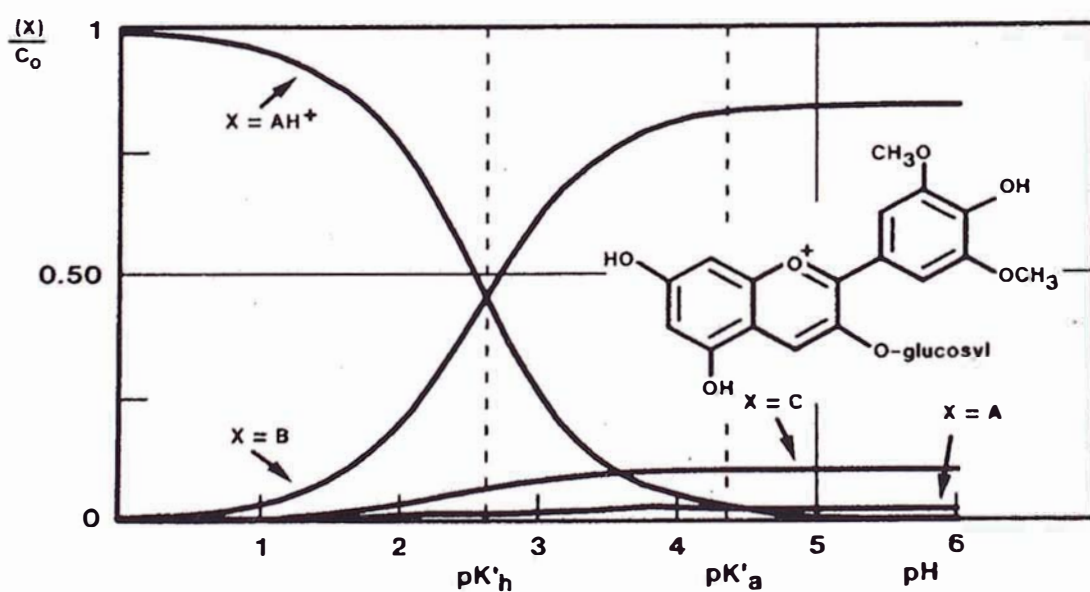


Figura N° 2.34.- Equilibrio de distribución para AH^+ , A, B, y C para el malvidin-3-glucósido en función del pH(48).

Por variaciones en el modelo de sustitución de los anillos del flavilio, las antocianidinas que existen principalmente en la forma quinoidal **A** o la forma **C**, la chalcona; pueden ser preparados. Este se puede observar en el cloruro de 4',7-dihydroxiflavilio (Figura N° 2.35) las cuales existen en la forma de chalcona a pH >3. y cloruro de 4-metil-7-hidroxi-4'-metoxiflavilio (Figura N° 2.36) que existe como un isómero quinoidal a pH >5. Por supuesto, que muchas sales de flavilio pueden formar mezclas de las formas quinoidal, chalcona y cromenol como se muestra para el cloruro de 4',5,7-trihydroxiflavilio (apigenidina, Figura N° 2.37). Muy recientemente, McClelland y Mcgall han mostrado que cloruro de 4'-hidroxiflavilio también existe como una mezcla de las formas quinoidal, chalcona, cromenol a pH alrededor de 7.

Durante los estudios cinéticos de Brouillard, se encontró que cualquiera de estas reacciones mostrados en la Figura N° 48 fueron endotérmicas. Calentando una solución de antocianina, se observa que el equilibrio se desplaza hacia la forma de la chalcona resultando en una disminución de la intensidad del color. Por enfriamiento podría revertirse el cambio aunque más de una hora puede requerirse para restablecer el equilibrio (124). El tiempo necesario para la reversión de la chalcona a la antocianina ha sido estudiado por Preston y Timberlake (91) para la separación de la chalcona del malvidin-3-glucósido y la chalcona del malvidin-3,5-diglucósido se utilizó cromatografía líquida de alta presión después de un enfriamiento rápido.

b) Efectos de la estructura sobre la estabilidad del color de las antocianinas

Asumiendo que una antocianina se mantiene a un pH ácido adecuado entre 2 - 3, debería ser estable a temperatura ambiente. Por ejemplo, la vida media de una antocianina típica, la cianidina - 3- rutinósido, es alrededor de 65 días a temperatura ambiente en ácido cítrico 0,01 M, a pH = 2,8. La correspondiente antocianidina libre, la cianidina, sólo tiene una vida media de 12 horas. La hidrólisis lenta del 3 - glicósido de una unidad de antocianina

bajo condiciones ácidas es presumiblemente responsable de que la antocianina se degrade a largo plazo respecto a la antocianidina libre. Los intentos de mejorar la estabilidad por metilación de los grupos fenólicos libres, en cambio, tiene un efecto opuesto.

En relación al estudio de la estabilidad de 4 antocianinas y 13 desoxiantocianidinas sintéticas, Ohta et al. encontraron que la peonidina y la malvidina tiene una estabilidad mucho menor que sus correspondientes 3-glicósidos a pH 2,5 y 4.5. El resultado de estos estudios conducen a dos conclusiones :

- i La presencia de un grupo 7-OH mejora enormemente la estabilidad
- ii La adición de grupos OH en en al anillo B disminuye la estabilidad

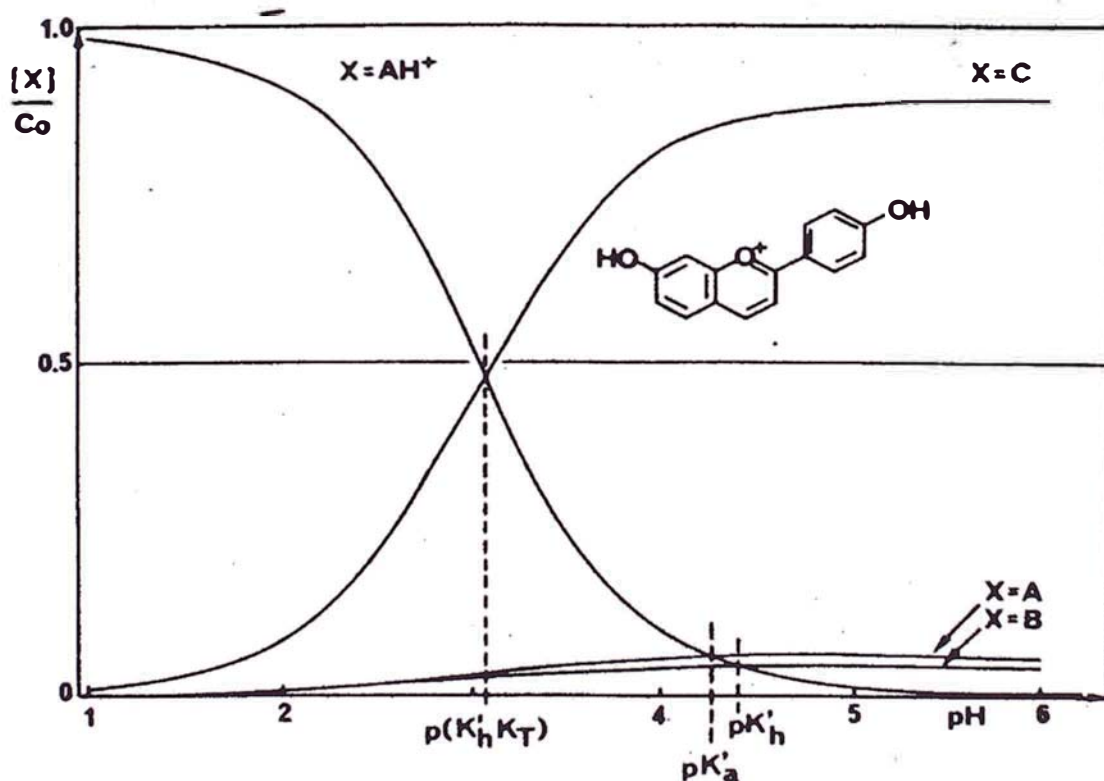


Figura N° 2.35.- Equilibrio de distribución de las formas: AH^+ , A, B y C para el cloruro de 4',7- dihidroxi-flavilio en función de pH(48).

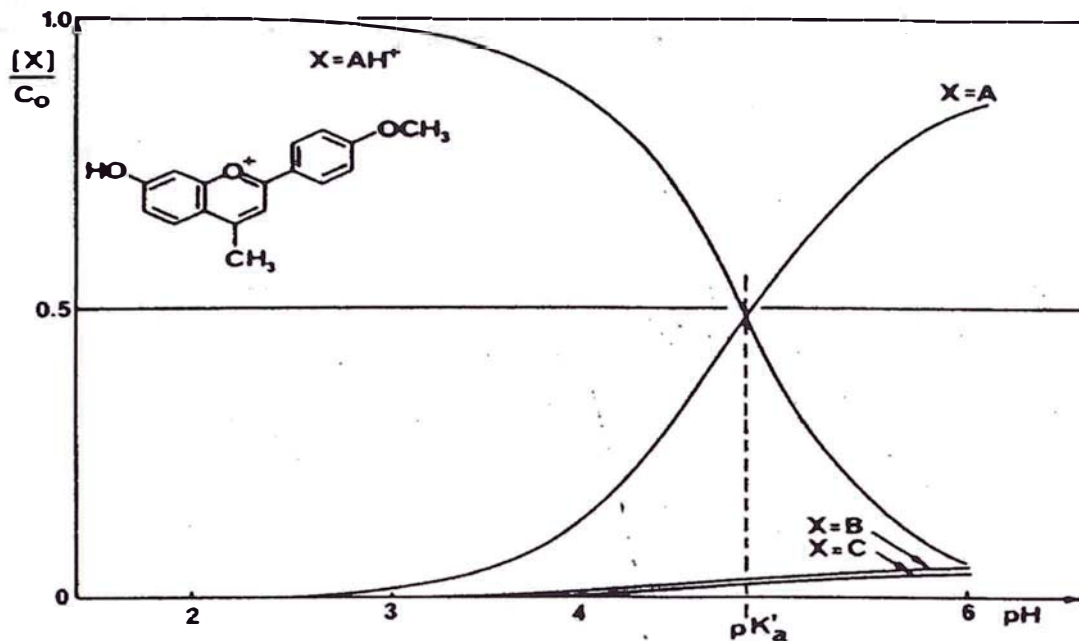


Figura N° 2.36.- Equilibrio de distribución para las formas AH^+ , A, B y C del cloruro de 4'-metoxi-7-hidroxi-flavilio como función del pH(48).

Los estudios con 3-desoxiantocianidinas sintética están resumidas en el anexo N° 10. De esta tabla se hace evidente que la presencia de cualquiera de los 4'-OH y 7-OH confieren estabilidad, mientras que la metilación de estos hidroxilos la disminuyen. La introducción de un grupo vinilo entre C2 y el anillo B da un 3-desoxantocianidina de color rojo (82) resultando también menos estable. Curiosamente, de todas las sales de flavilio sintéticas examinadas, la apigenidina mostró la mayor estabilidad.

La naturaleza de los productos formados durante mucho tiempo permanecieron desconocidos. Estudios cinéticos han mostrado que la reacción de descomposición es de primer orden respecto a la antocianina en un rango de pH entre 2,5 - 4,5. El probable mecanismo de reacción podría involucrar:

- i La hidrólisis de la antocianina a antocianidina (3-OH libre), el cual hidrocatalíticamente podría ser degradado en α , β - dicetona, y
- ii Reacción con el oxígeno para dar un producto de degradación o productos de copulación fenólicas . La oxidación fenólica como una posible mecanismo es además respaldado por la aceleración de la descomposición con el incremento del pH y un cambio de

color hacia el marrón es generalmente observado.

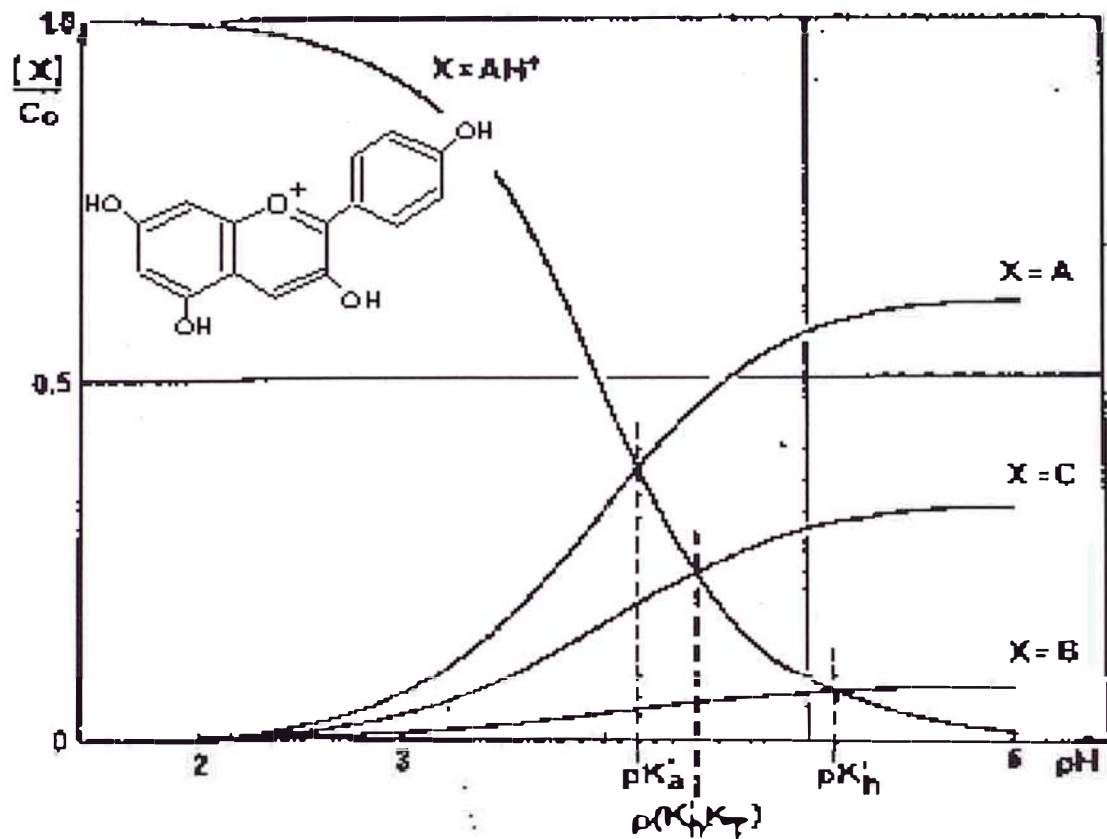


Figura N° 2.37.- Equilibrio de distribución para las formas AH^+ , A, B y C del cloruro de apigenidina como función del pH(48).

En una mezcla compleja de compuestos fenólicos como en el de los vinos pueden ocurrir condensaciones entre los taninos y las antocianinas. En el vino tinto, por ejemplo, el peso molecular de la fracción coloreada se incrementa lentamente con el tiempo debido a las reacciones de condensación antocianina-taninos.

Un método sugerido para incrementar la estabilidad de las antocianidinas implica la sustitución de la posición 4 con un grupo metilo o fenilo. Si bien estos compuestos muestran mejor resistencia al decoloramiento en la presencia de SO_2 o en ácido ascórbico, su comportamiento en soluciones acuosas es similar a la de los compuestos originales no sustituidos.

La sustitución de un grupo carboxi en la posición 4 también da un compuesto cuya

estabilidad a $\text{pH} = 2,8$ es similar a la de la apigenidina. El 4-carboxi antocianidina posee una propiedad interesante, la de ser estable a pH neutro.

c) Reacciones de oxidación

i *Reacciones con ácido ascórbico / O_2*

Las antocianinas como una clase de compuestos son ampliamente conocidos por ser particularmente inestables en la presencia de ácido ascórbico (77 , 78). El rol de O_2 en esta reacción es conocido desde hace tiempo y se explica sobre la base de las propiedades de auto-oxidación del ácido ascórbico. La importancia del O_2 fue además indicado sobre el estudio de los efectos inhibitorios sobre el decoloramiento de las antocianinas por antioxidantes fenólicos así como en la quercetina. Observaciones posteriores han reafirmado el rol esencial del O_2 en el decoloramiento de las antocianidinas por el ácido ascórbico. Después de una exclusión rigurosa del aire, por evacuaciones sucesivas con corrientes de argón, el ácido ascórbico fue incapaz de decolorar la apigenidina durante 10 días continuos, pero lo hizo en pocas horas cuando el aire fue admitido nuevamente. El decoloramiento es el resultado de una degradación oxidativa del anillo pirilio de la apigenidina el cual se evidencia por caracterizaciones con cromatografía de gases y espectrometría de masa encontrándose como productos de degradación : fluoroglucinol, hidroquinona y ácido p-hidroxibenzoico.

La sugerencia de que el decoloramiento es el resultado del ataque del ácido ascórbico al catión flavilio se ha descartado. En realidad, el bloqueo de la función eno-diol auto-oxidable del ascorbato por metilación o acilación, como es el caso de la 3-O-metil y 2-O-isovaleril derivados se muestran en la Figura N° 2.38, inhibió el decoloramiento de la apigenidina en presencia del aire. Esta observación condujo al desarrollo de extractos de antocianinas con un mejoramiento en la estabilidad del color, conteniendo ácido 2-O-fosfatoascórbico como una fuente de vitamina C.

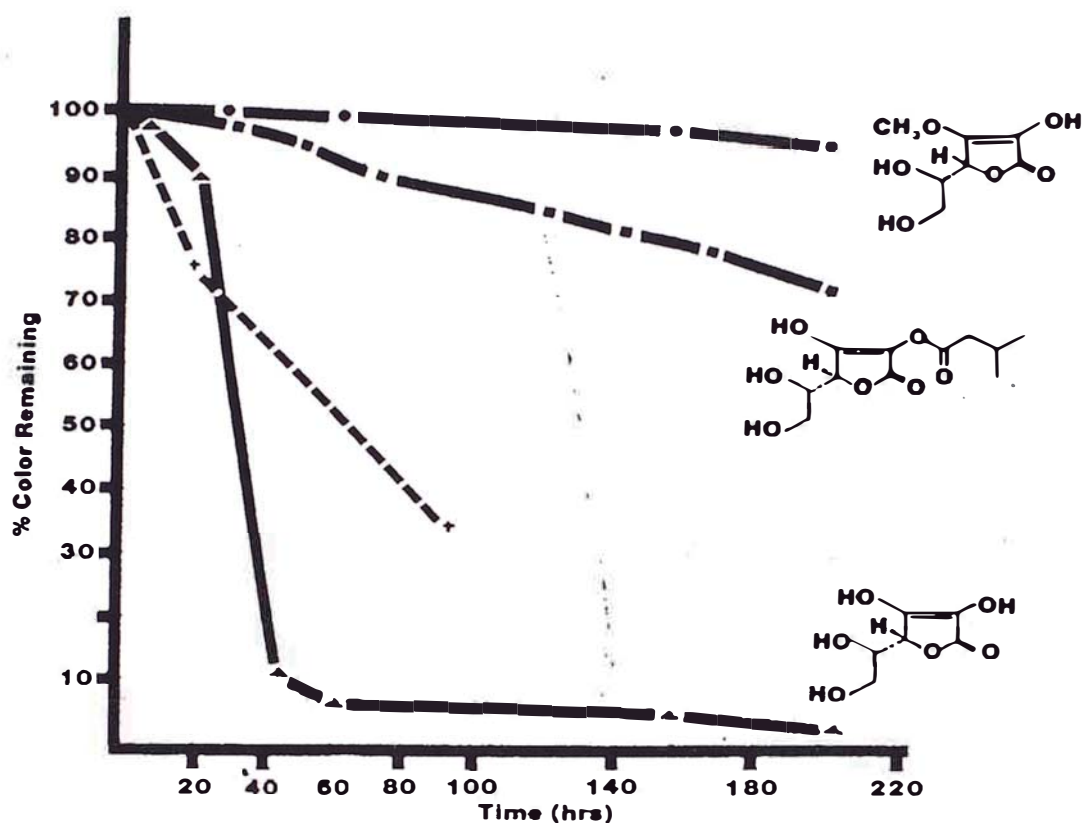


Figura N° 2.38.- Decoloración del cloruro de apigeninidina (20 ppm) por ácido ascórbico (---, 500 ppm) y por concentraciones equivalentes de ácido 3-O-metil ascórbico (·-·-·) y ácido 2-O-isovaleril ascórbico (--), en ácido cítrico 0,01 M (pH 2,8) saturado con aire, a temperatura ambiente. (++++) % de hidrólisis de ácido 2-O-isovaleril ascórbico seguido por HPLC(48).

La naturaleza exacta de la especie de oxígeno activado responsable del decoloramiento aun es objeto de estudio. Se sabe, sin embargo, que la autooxidación del ácido ascórbico conduce a la formación de H_2O_2 y ácido deshidroascórbico. La existencia del radical hidropéroxido, $HOO\cdot$, intermediario ha sido demostrado pero no es seguro si esta especie causa el decoloramiento o si reacciona con además con el H_2O_2 (reacción de Haber-Weiss) para dar radicales $HO\cdot$ como reactivo intermediario. La base que fundamenta el último mecanismo es haber encontrado rangos similares de productos de oxidación por tratamiento del cloruro de apigeninidina con el reactivo de Fenton, una fuente de radicales $HO\cdot$ cuando se comparó con los obtenidos por la oxidación con ácido ascórbico- O_2 .

ii Reacciones con Peróxido de hidrógeno

Las reacciones de antocianinas con H_2O_2 fue investigado por primera vez por Karrer, quién encontró que la malvidina reacciona con el H_2O_2 para dar malvona 5. En la malvona, si un azúcar residual está unido como ester puede ser fácilmente removido por hidrólisis con NH_4OH . Si el azúcar está unido a la posición C-5 puede ser removido por hidrólisis ácida. La oxidación con peróxido de hidrógeno se ha sugerido como un método la naturaleza de las unidades de azúcar unidos al C3 y C5.

En estudios más recientes, Hrazdina y Franzese han encontrado que la reacción tiene un curso diferente si es llevado a cabo la pH ~7 en vez de pH ~ 3 como lo describió Karrer. A pH ~ 7 las antocianinas existen casi exclusivamente bajo la forma de cromenol y da un derivado de coumarina 6, como el producto mayoritario.

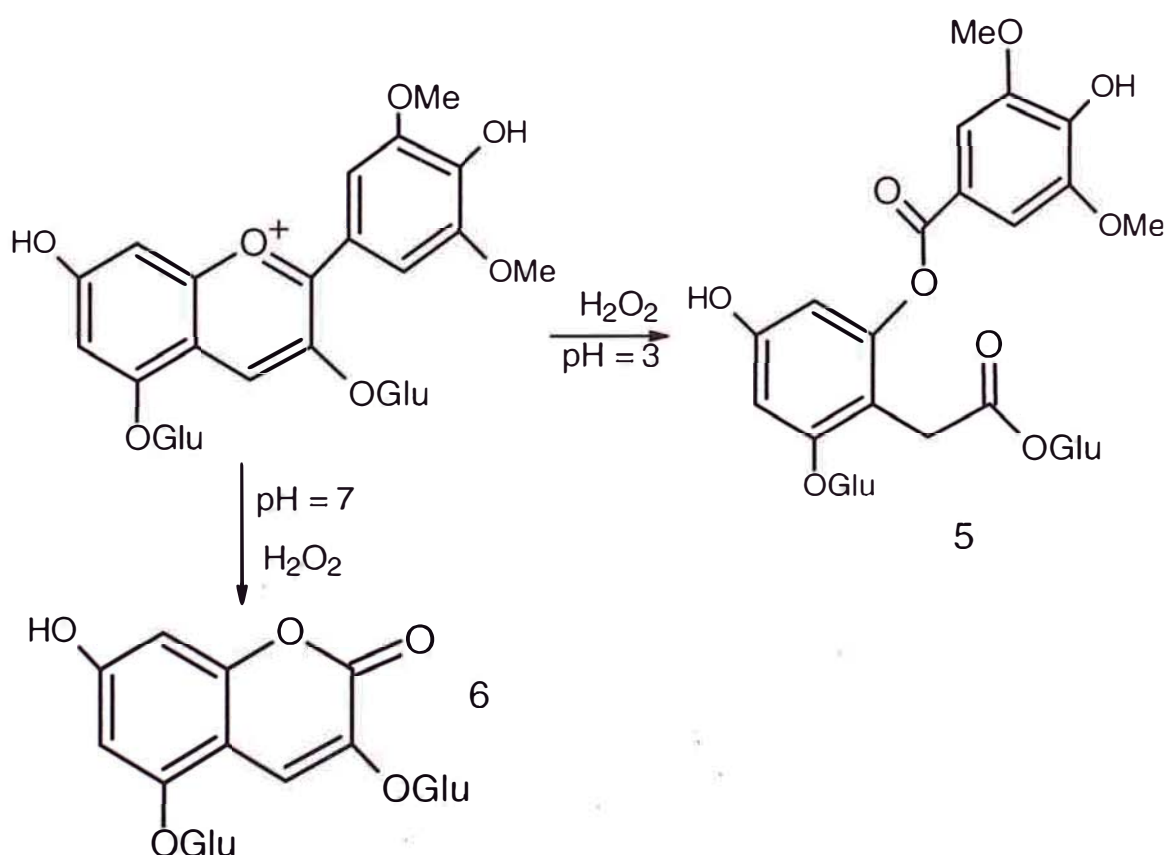


Figura N° 2.39.- Reacción de las antocianinas con el H_2O_2 .

Después, basados en los trabajos recientes de Dilthey y Qunit (79), Jurd (80, 81) se ha podido dilucidar el curso de la oxidación con peróxido de hidrógeno de las sales simples de flavilio. Cuando el catión flavilio contiene un 3-sustituyente, la oxidación ocurre en una serie de pasos los cuales dependen del pH. En soluciones acuosas de ácido acético, el anillo C es abierto para dar el producto de Baeyer-Williger 7. A pH más altos (5-7) la transferencia de un grupo acilo ocurre para dar el ester 8, el cual a continuación se convierte en acilbenzofurano 9. Un benzofurano del tipo 9 ha sido separado por Niebes y Janot (92) a partir de la oxidación controlada de la cianidina-3-glucósido-5-(6-O-p-cumaril-glucósido).

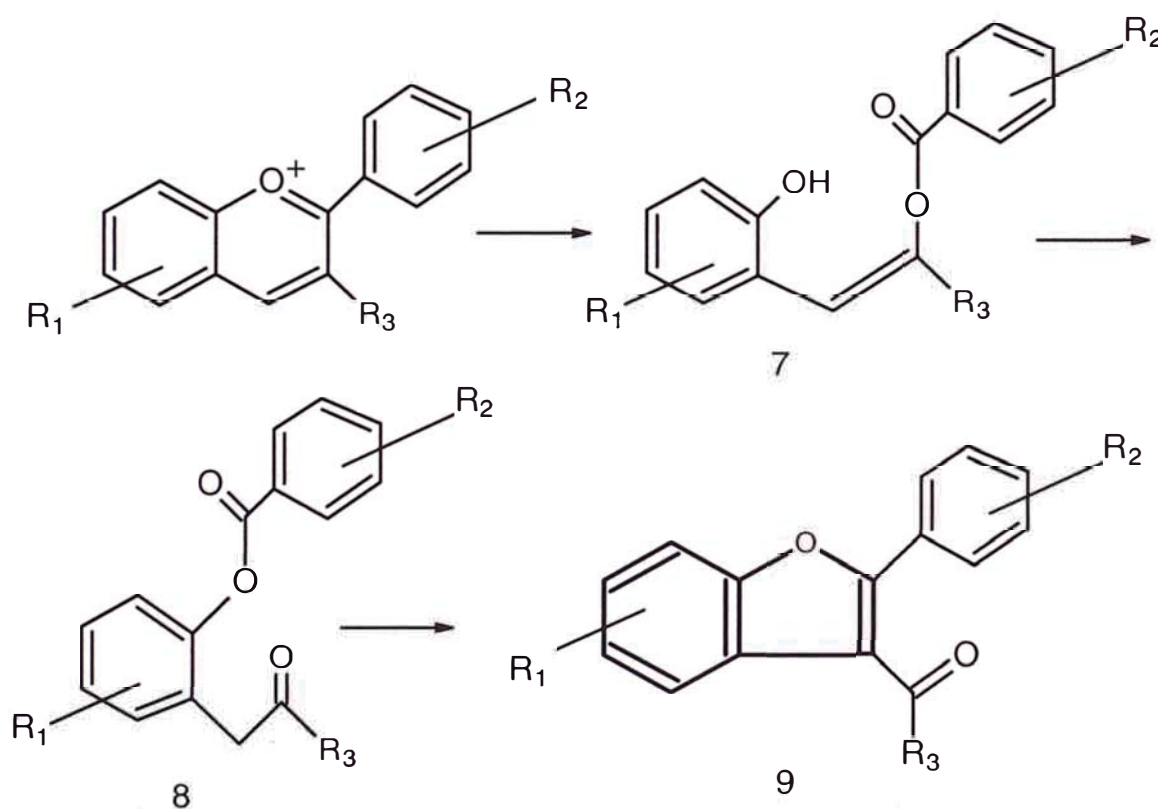
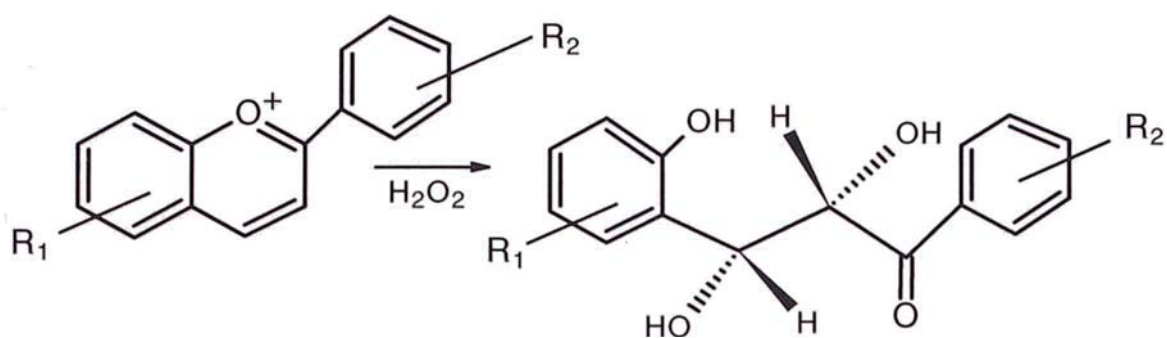


Figura N^o 2.40.- Curso de las reacciones de oxidación con H₂O₂.

Las sales de flavilio simples no sustituidas en la posición 3 siguen ruta diferente de oxidación, conduciendo a treo-dihidroxicetonas 10.



10

Figura N° 2.41.- Reacción de oxidación de sales de flavilio no sustituidas en la posición 3.

iii Otras reacciones de oxidación

En los comienzos de 1940, Karrer encontró que la oxidación con ácido perftálico de un aducto con metanol, **11**, de una sal simple de sal de flavilio 3- OMe condujo al correspondiente flavonol después de la hidrólisis.

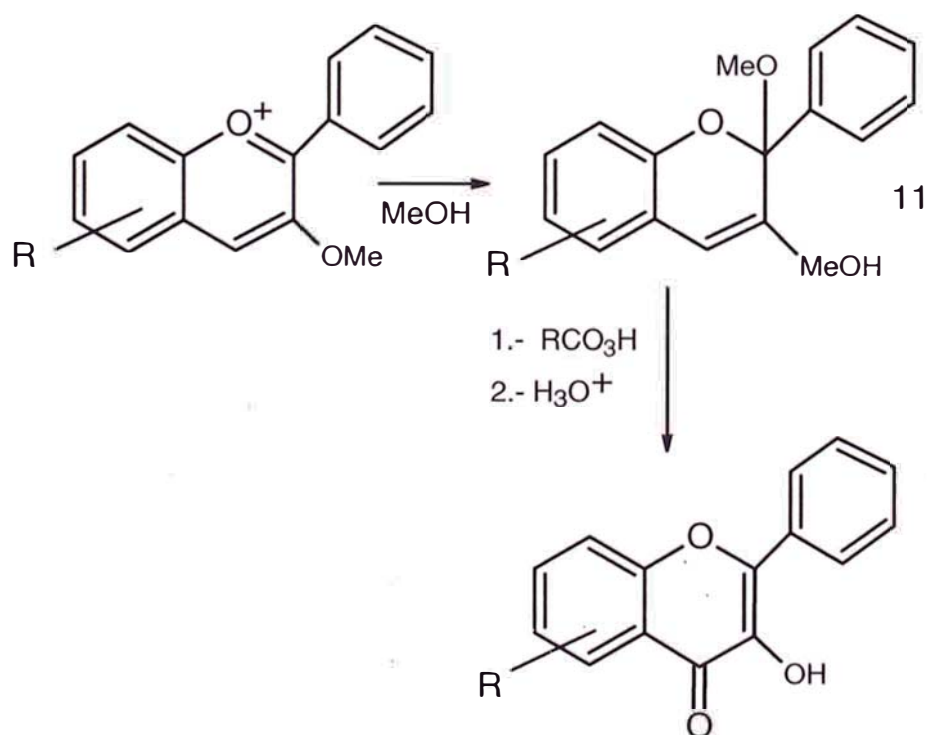


Figura N° 2.42.- Reacción de oxidación con ácido perftálico.

Más recientemente, las sales de flavilio han sido convertidas directamente a la correspondiente flavona con CrO_3 (reactivo de Sarett) y con mejores rendimientos con $\text{Tl}(\text{NO}_3)_3$.

d) Reacciones de Reducción

La hidrogenación catalítica de antocianinas o de las sales de flavilio resultan en la formación de los correspondientes derivados de las epi-catequinas **12**, o las flavanas en el caso de cationes de 3-desoxilflavilios.

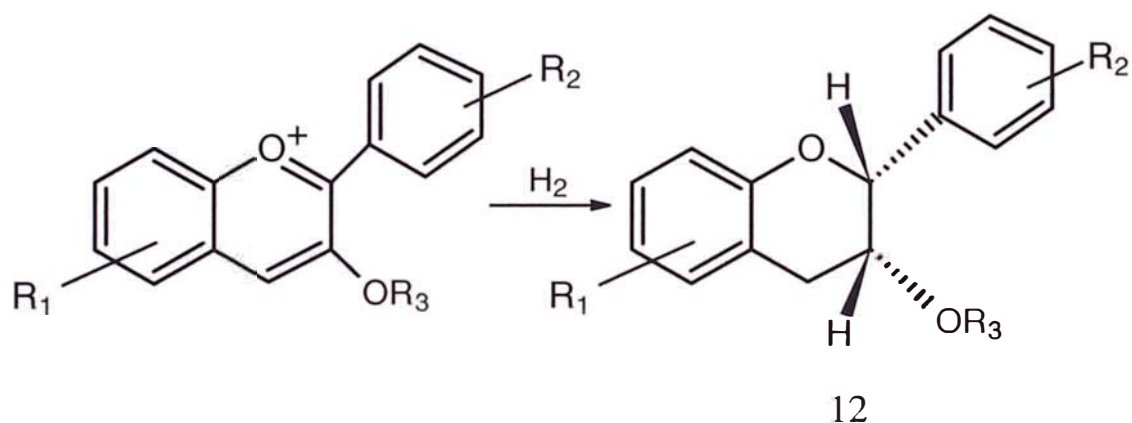


Figura N° 2.43.- Hidrogenación catalítica de antocianinas

La reducción de una sal simple con Zn tiene un curso más complejo, conduciendo a bisflavenos tal como **13**.

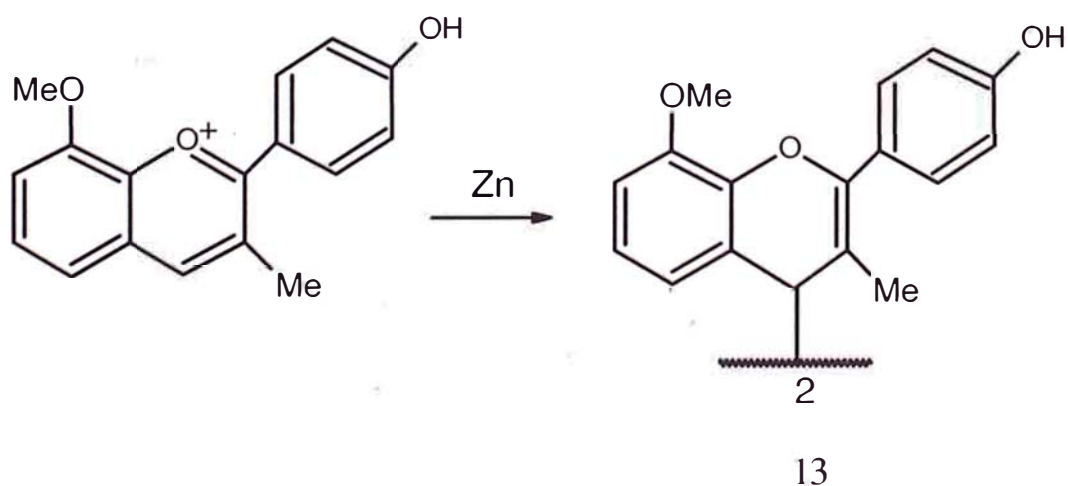


Figura N° 2.44.- Reducción con cinc metálico de antocianinas

El curso de la reducción de las sales de flavilio con hidruros metálicos complejos es objeto de algunas confusiones, hasta que en 1971, las estructuras de los productos flavenos fueron dilucidados por RMN-¹H. En general se encontró que las sales de flavilio con un grupo OR orientado en la posición 3 conduce a 3-flavenos **14**, mientras que las sales no sustituidas en la posición 3 dan 2-flavenos **15**.

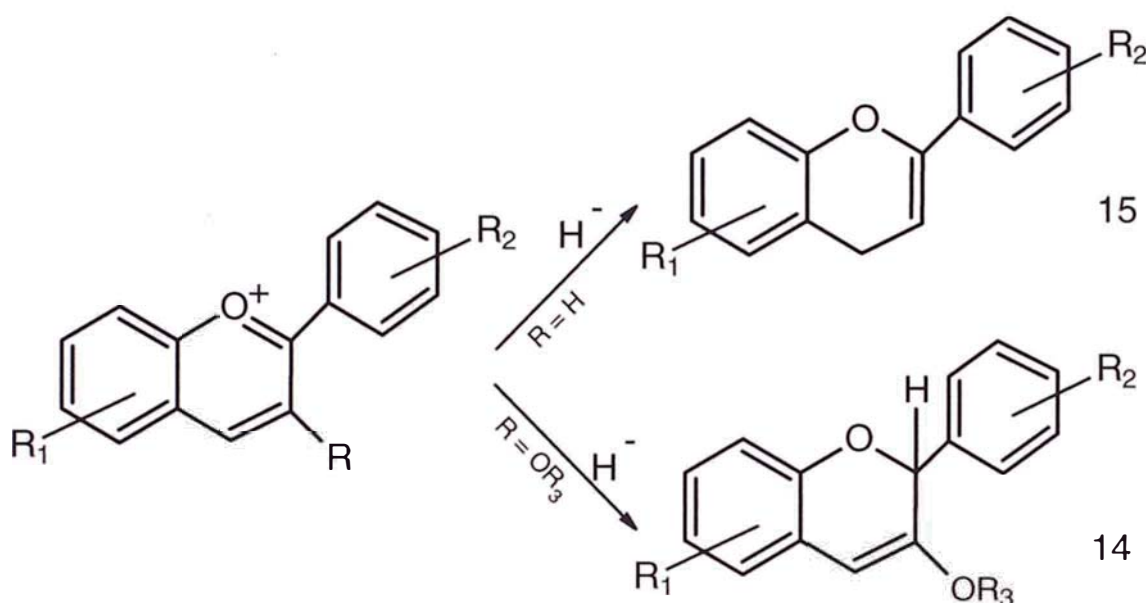


Figura N° 2.45.- Reducción de antocianinas con hidruro metálico

Estas asignaciones han sido confirmadas por Andrieux et al. (93). Las antocianidinas que tienen un grupo OH en la posición 3, conducen a la correspondiente epi-catequinas cuando son reducidos con NaBH₄.

En una serie de experimentos cualitativos Hurst y Harbone han recomendado el uso de amalgamas de sodio con agentes reductores para antocianinas y otros flavonoides. Estos reactivos rompen el anillo C para conducir a fragmentos fenólicos similares a los obtenidos por calentamiento con bases acuosa.

e) **Reacciones con nucleófilos**

i *Reacción con bisulfito de sodio*

Las antocianinas son rápidamente decoloradas por la adición de SO₂, un agente antiséptico usado extensamente en la industria de los vinos para el control del crecimiento microbiano. La reacción de decoloramiento es reversible y depende del pH; formándose un aducto covalente en las posiciones C2 o C4 de el anillo de flavilio. La constante de equilibrio para la adición de HSO₃⁻ para varias sales de flavilio han sido determinadas, así como, la velocidad a la cual ocurre la reacción.

$$K = \frac{[A.HSO_3]}{[AH^+][HSO_3^-]}$$

Si el aducto es el isómero 2 o 4 no es conocido, sin embargo, el aducto 4 ha sido favorecido basado en la inhibición de la reacción por sustitución de catión flavilio con grupos metilo o fenilo en la posición 4.

ii *Reacción con otros Nucleófilos*

La reacción de las sales de flavilio con nucleófilos procede en realidad en aquellos casos donde la posición 5 de las sales de flavilio no está sustituido. Para nucleófilos de carbono el ataque ocurre en la posición C4 dando un producto 4-sustituido del 2-flaveno. Algunos ejemplos incluyen acetilacetona, fluoroglucinol, catequina, 4-hidroxicoumarina, dimetilamina y fenol. En varios casos, una reacción adicional ocurre entre el OH fenólico y el 2-flaveno para conducir a una estructura bicíclica.

Finalmente, reactivos de Grignard también fueron usados para dar 2-flavenos 4-sustituidos y nucleófilos de nitrógeno han sido estudiados menos extensamente que los nucleófilos de carbono. Los aminoácidos reaccionan para dar el 2-flaveno C4-sustituido.

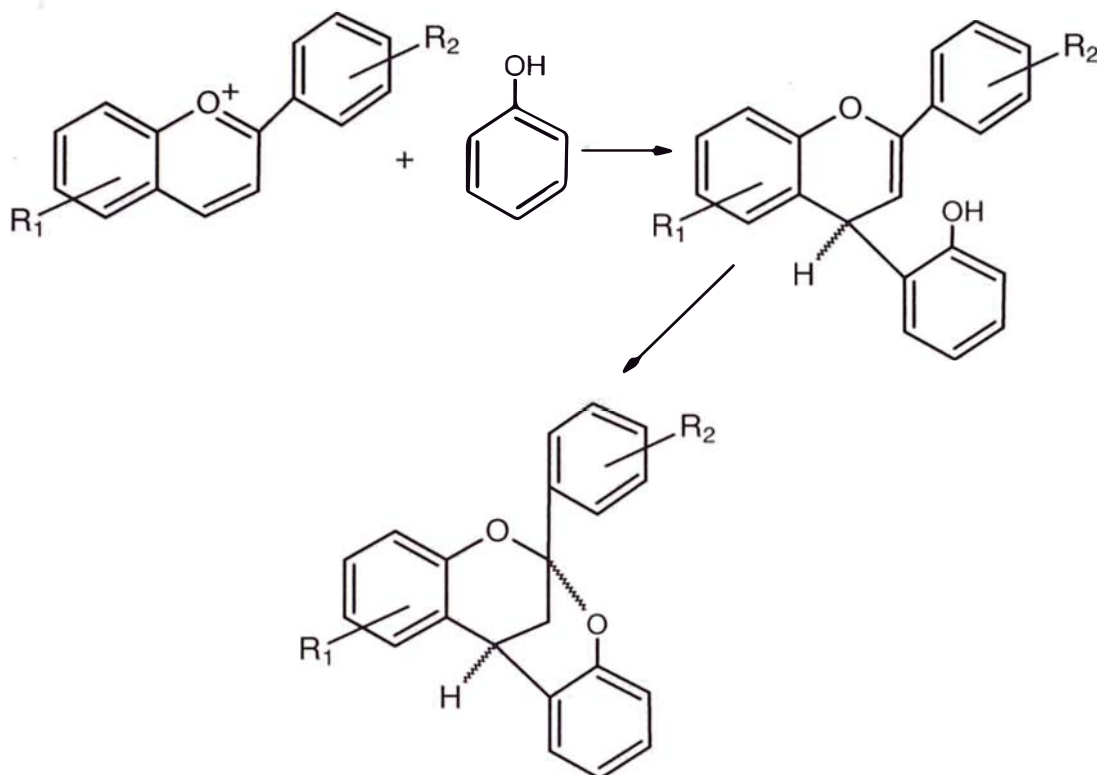


Figura N^o 2.46.- Reacción del 2-flavono con el fenol

f) Reacciones con electrófilos

La carga positiva inherente en el anillo flavilio proporciona a estas moléculas la resistencia a los ataques electrofílicos. El perclorato de flavilio ha sido, sin embargo, nitrado por sustitución de posición 3' del anillo B. Más recientemente, Timberlake y Bridle han encontrado que las antocianinas reaccionan con catequinas y acetaldehído para dar productos de un color mejorado. Aunque las estructuras de estos productos aun no han sido determinadas, los autores han sugerido que la reacción ocurre en C8 de las antocianinas enlazadas al C8 de las catequinas, a través del grupo $\text{CH}_3\text{-CH}$. Este podría estar de acuerdo con la preponderancia a la bromación de C8 de la catequina y a la formación de dímeros puente $8\text{-}8'\text{CH}_2$ en la reacción de pentametilquecercina con el formaldehído.

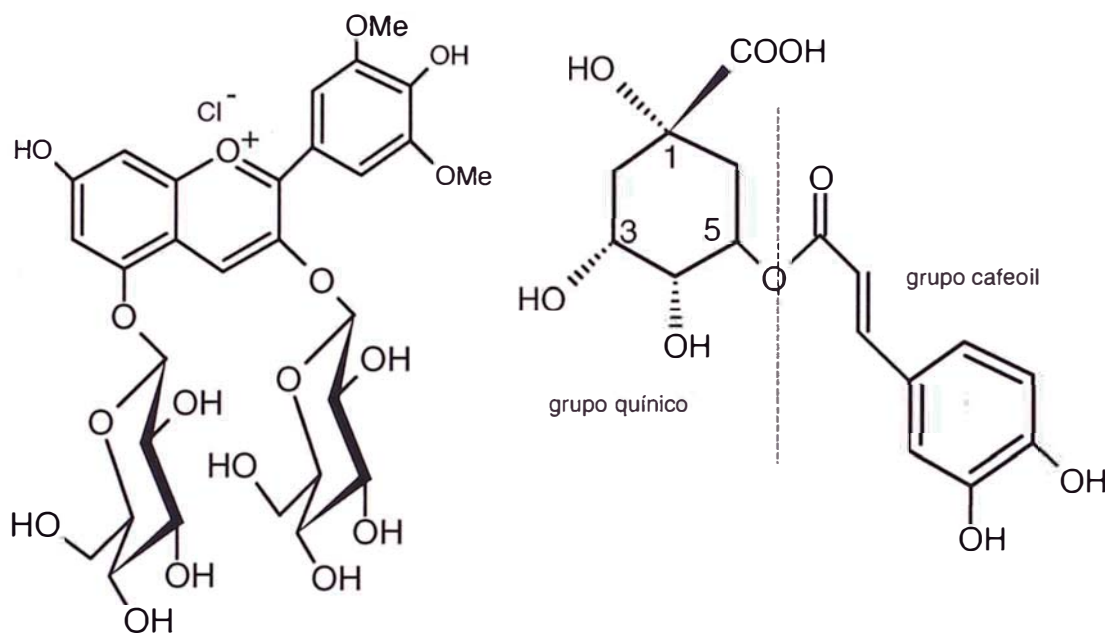
2.- Copigmentación

Como parte del esfuerzo general para mejorar los conocimientos de los fenómenos involucrados en la pigmentación de las plantas, se reportan los resultados de la investigación de Brouillard (83) sobre las reacciones de copigmentación de antocianinas. Los copigmentos tienen un fuerte efecto estabilizante sobre las antocianinas y su ausencia bajo las condiciones físico-químicas que prevalecen en la naturaleza en la cual las antocianinas ocurren, éstas se encontrarían esencialmente bajo alguna forma incolora.

La reacción de copigmentación de antocianinas fue observada por primera vez por Robinson en 1931. El fenómeno ocurre cuando el copigmento es añadido en suficiente concentración en un medio ligeramente ácido a una solución de antocianina produciendo un incremento de la intensidad y un cambio en el color, el cual es designado como el efecto « bluing ». Con los avances de la espectroscopia de UV-Visible, fue extensamente observado que los copigmentos generalmente producen un incremento en la absorbancia en el rango visible (*efecto hiperacrómico*) y el desplazamiento de la absorción hacia mayores λ (*efecto batocrómico*). Las moléculas que actúan como copigmentos incluyen una larga variedad de compuestos estructuralmente no relacionados, tales como flavonoides, polifenoles, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos, y las propias antocianinas. De estas sustancias, sin embargo, sólo los flavonoides han sido investigados con mayor detalle. Los flavonoides, los cuales son incoloros, y los polifenoles son generalmente encontrados en asociación con las antocianinas en los vacuolos de las células coloreadas de los órganos de las plantas superiores. Sin embargo, el fenómeno de copigmentación está extendido en la naturaleza. El también ocurre en los productos de las frutas y vegetales tales como sus extractos y los vinos.

La intensidad del efecto de la copigmentación se ha demostrado que depende de varios factores tales como: concentración de antocianinas y del copigmento, sus estructuras químicas, el pH, el solvente y la temperatura. La magnitud del efecto de la copigmentación, a una determinada proporción de concentración de copigmento a concentración de antocianina, en un determinado buffer de agua y a temperatura ambiente, es generalmente

estimado por el incremento de la absorbancia, a λ max absorción en el visible y por el desplazamiento de λ hacia longitudes de onda mayores. Hasta la fecha del presente artículo, estos cambios en las características espectrales de las soluciones antocianina- copigmento han sido reportadas empíricamente, sin un fundamento teórico que los justifique.



Cloruro de malvina (AH⁺)

Ácido clorogénico

Figura N° 2.47.- Estructura de la malvina y el ácido clorogénico

En el presente trabajo se desarrolla una nueva aproximación al estudio de las interacciones moleculares antocianina-copigmento con el sistema cloruro de malvina-ácido clorogénico. El cloruro de malvina (malvinidina-3,5-diglucósido) es una antocianina común, y su color esta largamente influenciada por la presencia de los copigmentos. El ácido clorogénico, ácido (5-O-cafeoilquínico) es una molécula fenólica incolora extensamente difundida en la naturaleza, suficientemente soluble en el agua, y conocido como un excelente copigmento. Los estudios cuantitativos llevados a cabo por Brouillard (83) se intenta interpretar los factores involucrados en la estabilidad del complejo malvina-ácido clorogénico, para dar, por primera vez, el mecanismo asociado con el proceso de copigmentación. Los siguientes factores fueron investigados y dilucidados:

- i** La naturaleza de la estructura de la malvina directamente involucrado en la copigmentación.
- ii** El número de moléculas de ácido clorogénico complejadas con la estructura de la malvina.
- iii** El valor de la constante de equilibrio y las características de la estabilidad de los complejos en el rango de temperatura del agua líquida.
- iv** La entalpía y entropía de la reacción de copigmentación.
- v** El papel fundamental jugado por la misma estructura de agua líquida.

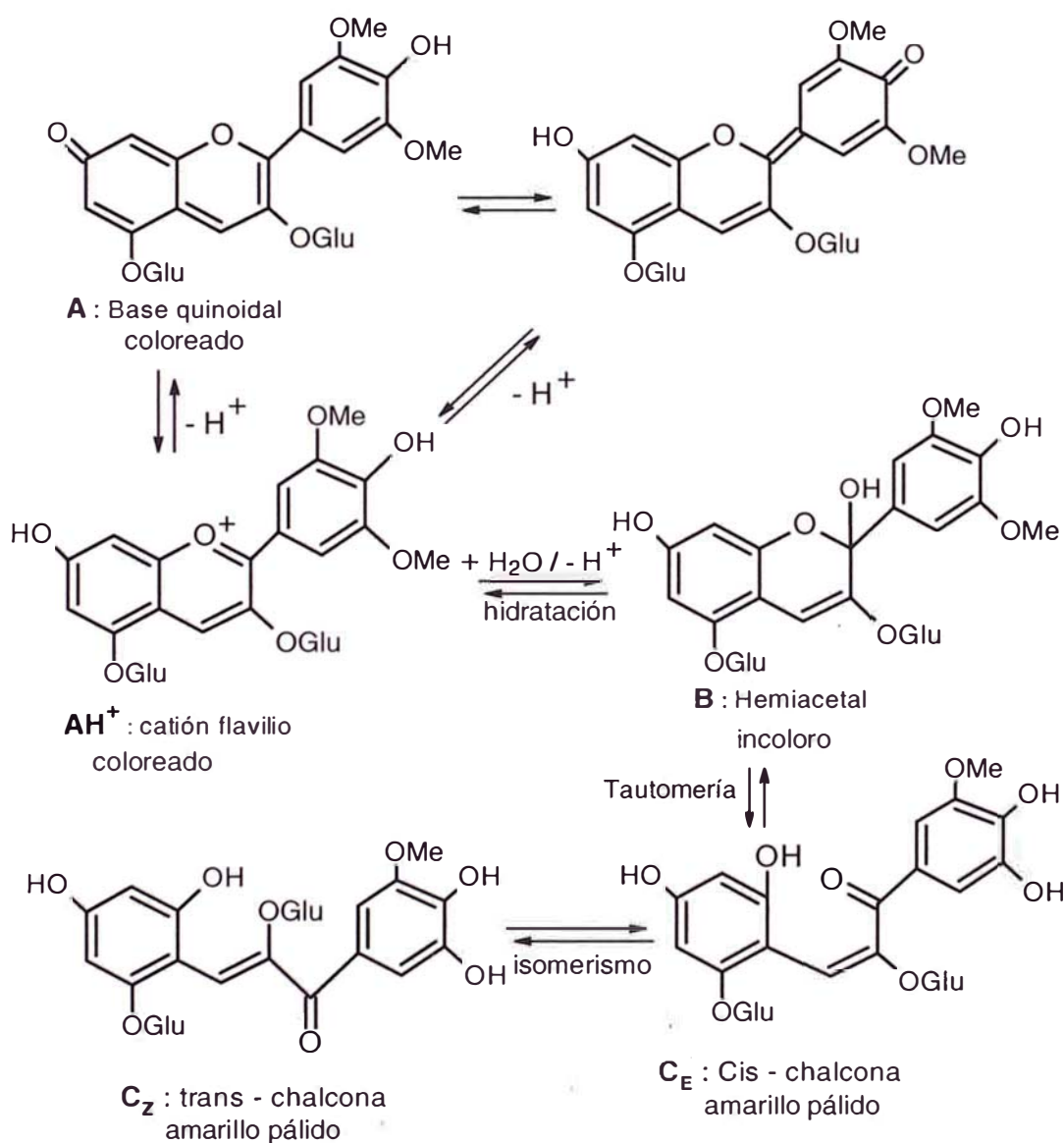


Figura N^o 2.48.- Transformaciones de la malvina en función del pH

a) Efecto del pH y del ácido clorogénico en el espectro de absorción de la malvina

Las transformaciones de la malvina en solución acuosa en función del pH son mostrados en la Figura N° 2.48. La malvina ocurre como un mezcla en equilibrio del catión coloreado flavilio (AH^+), la base coloreada quinoidal **A**, del hemiacetal incoloro y de la chalcona amarillo pálido C_E y C_Z . A pH bajo la estructura del flavilio se encuentra en mayor proporción, a partir de pH=2 hasta la neutralidad, las otras estructuras son más abundantes. Debido a los valores altos de las constantes de equilibrio de la reacción de hidratación, la malvina no puede conferir mucho color a la solución cuando el rango de pH está comprendido entre 3 y 7. En cambio, sólo un pequeño porcentaje de la concentración total de la malvina permanece estable en la forma fuertemente coloreada en estas condiciones ligeramente ácidas. Semejante resultado se demuestra claramente por la absorbancia débil de la solución de malvina a pH 3,65 como lo observa en el espectro « 0 » en la Figura N° 2.49. Esta absorción es característica del catión flavilio AH^+ . El máximo de absorción alrededor de 610 nm indica que a pH 3,65, una pequeña cantidad de la base quinoidal esta ya presente. Bajo tales condiciones la malvina esencialmente existe en la forma de un equilibrio tautomérico rápido entre el anillo-cadena : $B \rightleftharpoons C_E$. A 20°C, C_Z se encuentra en muy baja proporción.

En el trabajo de Brouillard se encontró que la adición de ácido clorogénico a la solución de malvina intensifica el color, a valores de pH entre 2 y 7. El valor de pH para la máxima intensificación del color se encontró que era 3,6. El gran incremento de la absorbancia observada, a la λ de máxima absorbancia, se multiplicó por un factor de 12,2 y fue obtenida para un concentración de solución de malvina de $2,58 \cdot 10^{-4}$ M a pH = 3,6 y 20°C a una razón molar copigmento a pigmento de 150. Esto queda claro en la discusión, sin embargo, está lejos de ser el aumento más alto que se podría obtener. La Figura N° 2.49 muestra un espectro visible estable de absorción típico de la malvina exclusivamente y en mezclas de malvina y ácido clorogénico. El ácido clorogénico es incoloro y no absorbe en el rango espectral mostrado en la Figura N° 2.49. La magnitud de ambos, del incremento de la

absorbancia y del desplazamiento batocrómico se dependientes de la concentración del ácido clorogénico. Es más, para una concentración analítica de ácido clorogénico, el incremento de la absorbancia, es también, marcadamente dependiente de la concentración analítica del pigmento. Resultados similares han sido reportados para otros pares de antocianina-copigmento(Anexo N°11).

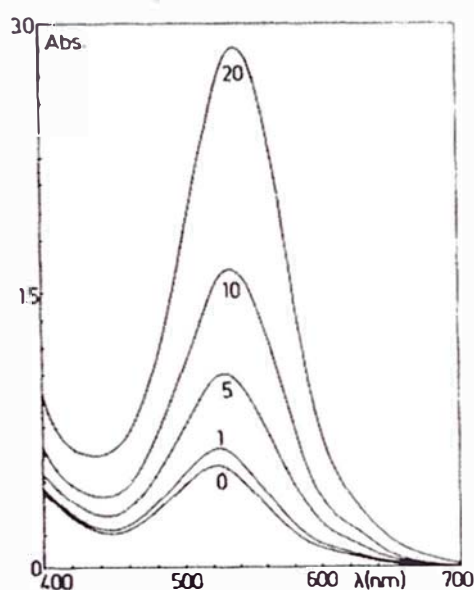


Figura N° 2.49.- Espectro visible de la malvina ($7,73 \cdot 10^{-4}$ M) y ácido clorogénico a una razón molar de: 0, 1, 5, 10 y 20: pH = 3,65 y 20°C ; $l = 1$ cm; solvente buffer acuoso de H_3PO_4 - CH_3COONa , con una fuerza iónica ajustada a 0,2M(83).

b) Efecto de la temperatura sobre el espectro visible de la Malvina con y sin ácido clorogénico

La figura N° 2.50 (parte inferior) ilustra que con el incremento de la temperatura se reduce fuertemente la intensificación del color producido por el ácido clorogénico. Por otro lado, el efecto térmico es mayor a bajas temperaturas que a mayores temperaturas. En contraste, una solución de malvina, al mismo pH sin ácido clorogénico, da un espectro visible de absorción casi idéntico, a cualquier valor de temperatura, Figura N° 2.50(parte de arriba).

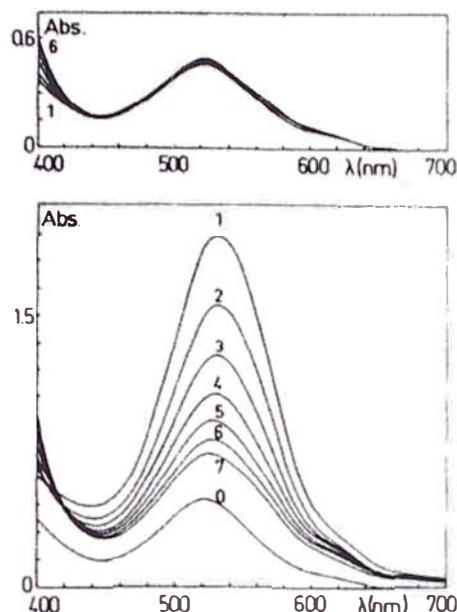


Figura N° 2.50.- Parte superior: Espectro visible de la malvina ($7,73 \cdot 10^{-4}$ M) a 10 (1), 20, 30, 40, 50 y 60°C (6): pH = 3,65 y 20°C ; $l = 1$ cm; solvente buffer acuoso de $H_3PO_4 - CH_3COONa$, con una fuerza iónica ajustada a 0,2 M.

Parte inferior: Espectro visible de la malvina exclusivamente (0), y malvina con ácido clorogénico a 10 (1), 20 (2), 30 (3), 40 (4), 50 (5) y 60 (6) y 70°C (7) para una concentración de malvina ($7,73 \cdot 10^{-4}$ M) : pH = 3,65 y 20°C ; $l = 1$ cm; solvente buffer acuoso de $H_3PO_4 - AcONa$, con una fuerza iónica ajustada a 0,2 M (83).

Los pequeños cambios observados en el último caso, relacionan solo el desplazamiento del equilibrio bajo la influencia de las variaciones de la temperatura y muy pequeños cambios en los de pH de sistema buffer. Una gráfica de absorbancia, a λ_{max} versus la temperatura de tres soluciones de malvina-ácido clorogénico se muestra en la Figura N° 2.51. La extrapolación de la curva indica que, alrededor de 100°C, el efecto del copigmento debe ser muy débil, a cualquier concentración de ácido clorogénico. El efecto de la temperatura, sobre el copigmetación de antocianinas por taninos, fue mencionado a comienzos de 1931 por Robinson pero el presente trabajo es el primer reporte de orden cuantitativo. Es más, tal efecto térmico considerable es probable que nunca haya sido observado sobre la banda de absorción. Es importante notar que, cuando la solución a 70°C (espectro 7 de la Figura N° 2.50) es enfriada a 10°C, resulta formando un espectro parecido al espectro 1,

de la misma figura. Se puede concluir que no ocurre la descomposición de la malvina durante el decrecimiento de la absorbancia con el aumento de la temperatura.

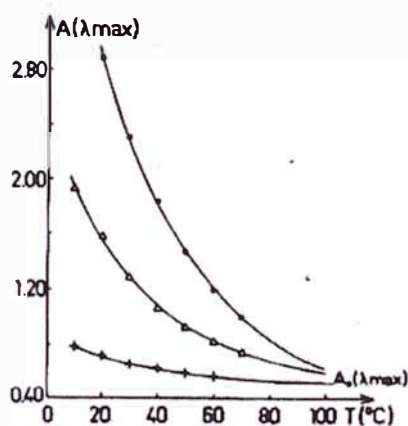


Figura N°2.51.-Influencia de la temperatura sobre el máximo de absorción de la malvina ($7,73 \cdot 10^{-4}$ M) con ácido clorogénico, con una razón molar de copigmento a pigmento de 20 (●), 10(Δ) y 2(+), pH = 3,65; $l = 1$ cm ;solvente buffer acuoso de H_3PO_4 - CH_3COONa , con una fuerza iónica ajustada a 0,2 M. A_0 es la absorbancia, en el máximo de absorción en la ausencia de ácido clorogénico(83).

Brouillard (1982) sugirió la posibilidad de que las interacciones hidrofóbicas entre el anillo pirilio y los radicales aromáticos de los grupos acilo, protegerían a la antocianina del ataque nucleofílico del agua, aumentando la estabilidad de las mismas.

La formación de enlaces puente de hidrógeno, las insaturaciones adicionales en la posición C-2 y C-3, la estructura del complejo formado, la fuerza electrostática y el efecto estérico pueden estar relacionados con los mecanismos asociados que inducen a un mayor estabilidad de las antocianinas aciladas(84 , 85).

Segun Goto y Kondo (86), pueden existir tres mecanismos básicos de estabilización de antocianinas: copigmentación intramolecular, copigmentación intermolecular, y autoasociación, con involucramiento de antocianidinas, de flavonoides o ácidos aromáticos y de azúcares (Figura N° 2.52).

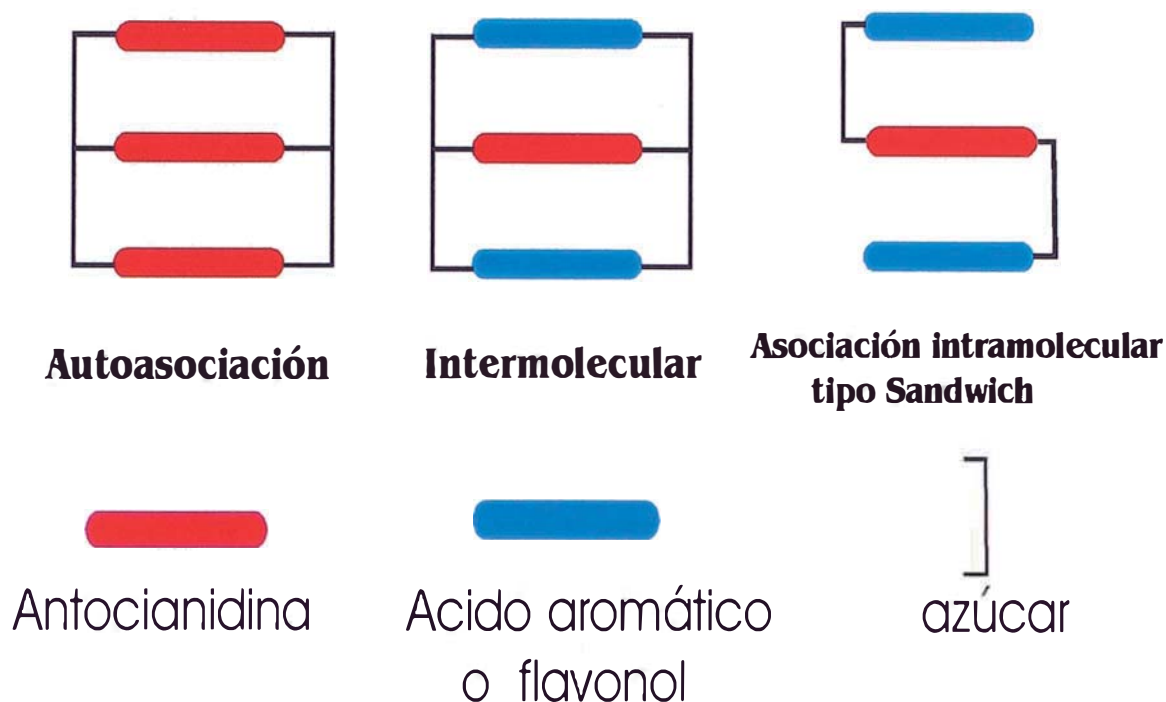


Figura N° 2.52.- Esquema representativo de tres tipos de copigmentación(86).

c) Copigmentación por auto-asociación

Cuando la concentración de las antocianinas es relativamente alta, las antocianinas pueden actuar como copigmentos de sí mismos. Las soluciones de antocianinas muy diluidas presentan una intensificación de la coloración cuando son pigmentadas con rutina, pero éste aumento de la absorbancia paulatinamente es reducido a medida que se aumenta la concentración de antocianina. Según Scheffeldt y Hrazdina (84), esta menor disponibilidad de antocianinas para la copigmentación con la rutina, puede ser atribuida a la estabilización del catión flavilio por medio de la **auto-asociación** cuando están en concentraciones más elevadas.

En 1972, Asen et al. (87) reportaron que λ de máxima absorbancia de soluciones de antocianinas no se incrementa linealmente con la concentración. A una concentración de 0,01 M y pH = 3.14, las absorbancias son tres veces mayor de lo esperado por la ley de Lambert-Beer. Asen et al. atribuyen este efecto a la auto-asociación de las moléculas de

antocianinas a elevadas concentraciones. Este efecto fue posteriormente descrito por Scheffeldt y Hrazdina (84) en un trabajo de copigmentación sobre flavonoides. La naturaleza exacta del complejo formado a pH = 3 permanecen aun desconocidos, pero en estudios recientes de Hoshino y colaboradores (88) que a pH = 7 se comprobó con evidencia irrefutable que el apilamiento vertical de las bases quinoidales de las antocianinas ocurre a este pH.

En los trabajos más recientes de Hoshino et al. (89) reportaron los estudios de RMN-¹H de las bases quinoidales de la malvidina-3,5-diglucósidos y se mostró que los desplazamientos químicos de los protones aromáticos se desplazan hacia campos altos con el incremento de la concentración. Esto se debe, probablemente a las corrientes diamagnéticas anisotrópicas causadas por las corrientes en el anillo de las moléculas aromáticas asociadas.

Finalmente Hoshino et al. en otras investigaciones han reportado con más detalle que los cationes flavilio también forman agregados de auto-asociaciones quirales similares a las bases quinoidales.

d) Copigmentación intramolecular

La copigmentación intramolecular solamente ocurre cuando un pigmento y el copigmento son partes de una única molécula, o sea, cuando el cromóforo de la antocianina y un residuo de ácido cinámico (copigmento) están covalentemente ligados al mismo residuo de azúcar. La copigmentación intramolecular es más eficiente que la estabilización de las antocianinas por una copigmentación intermolecular, pues desde un punto de vista termodinámico, el efecto intramolecular tiene la ventaja entrópica sobre el efecto intermolecular. La estabilidad del color de las moléculas aciladas causada por el fenómeno de copigmentación intramolecular, en el cual los residuos aromáticos, interactúan con el sistema π del anillo pirilio, protegiendo las formas coloridas contra el ataque nucleofílico del agua (Figuereido et al. 1995).

La copigmentación intramolecular es posiblemente la responsable de la extraordinaria

estabilidad de los cromóforos de las antocianinas poliacyladas (Brouillard, 1981), como ocurre con la zebrina, extraída de *Zebrina Pendula* (Goto y Kondo, 1991) cuya coloración es exclusivamente producida por el pigmento en sí, sin ninguna interferencia de otros grupos como iones metálicos y copigmentos. Los residuos aromáticos de los grupos acilo se alinean de tal forma que el anillo pirilio del catión flavilio está impedido para el ataque del agua en C-2 y C-4 de los anillos.

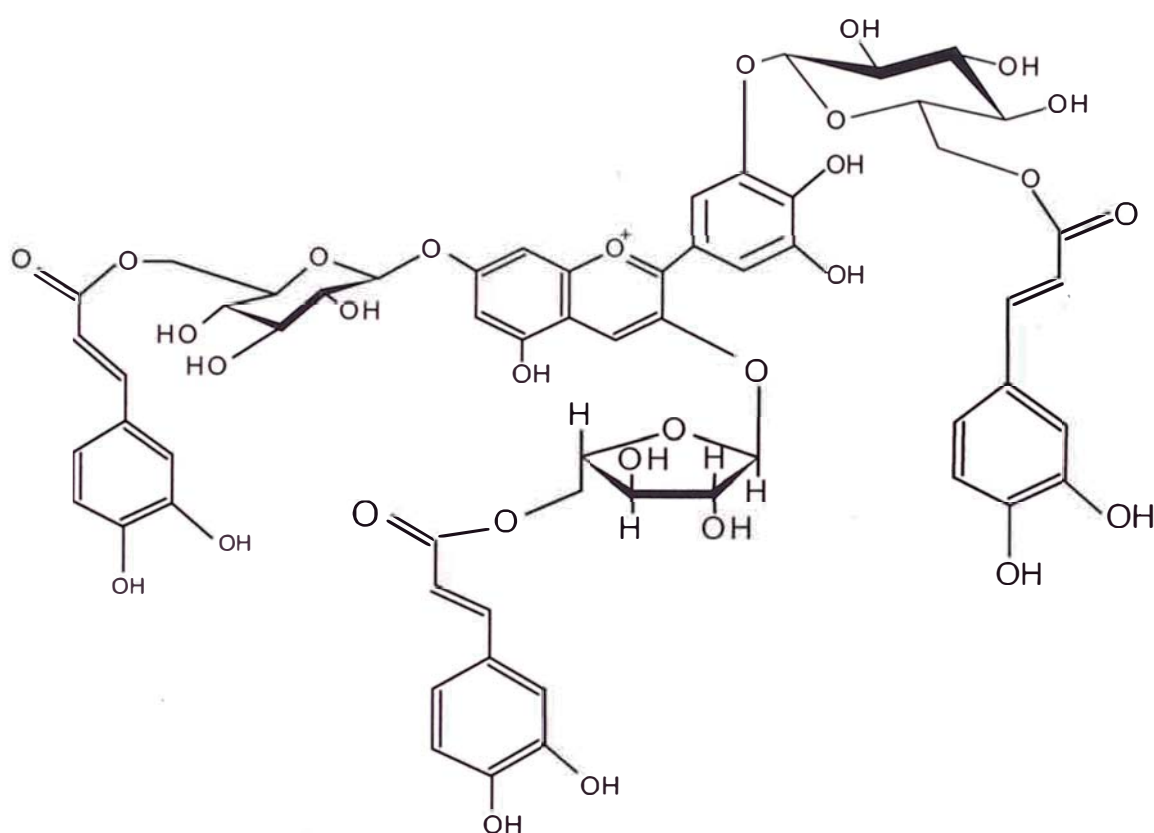


Figura N° 2.53.- Estructura química de la antocianina extraída de la Zebrina pendula

Con la dificultad para la hidratación de la molécula se genera aparentemente un impedimento para las reacciones de transferencia de protones y, por el proceso de superposición de moléculas, la estabilidad de los cromóforos aumenta sensiblemente. Probablemente las fuerzas que actúan en el proceso de superposición sean fuerzas hidrofóbicas.

Varios autores han notado la presencia de iones metálicos (Mg^{+2} , Fe^{+3}) en antocianinas altamente aciladas, pero en la mayoría de estos casos no parece ser requerido para la

estabilidad de color. Por supuesto, se conoce por años que las antocianinas que contienen grupos dihidroxilo vecinales en el anillo B generan un desplazamiento batocrómico entre 30 - 50 nm en el espectro visible por la adición de iones Al^{+3} . Estos complejos son inestables y descomponen (precipitan) con el tiempo.

e) Copigmentación por formación de complejos con flavonoides

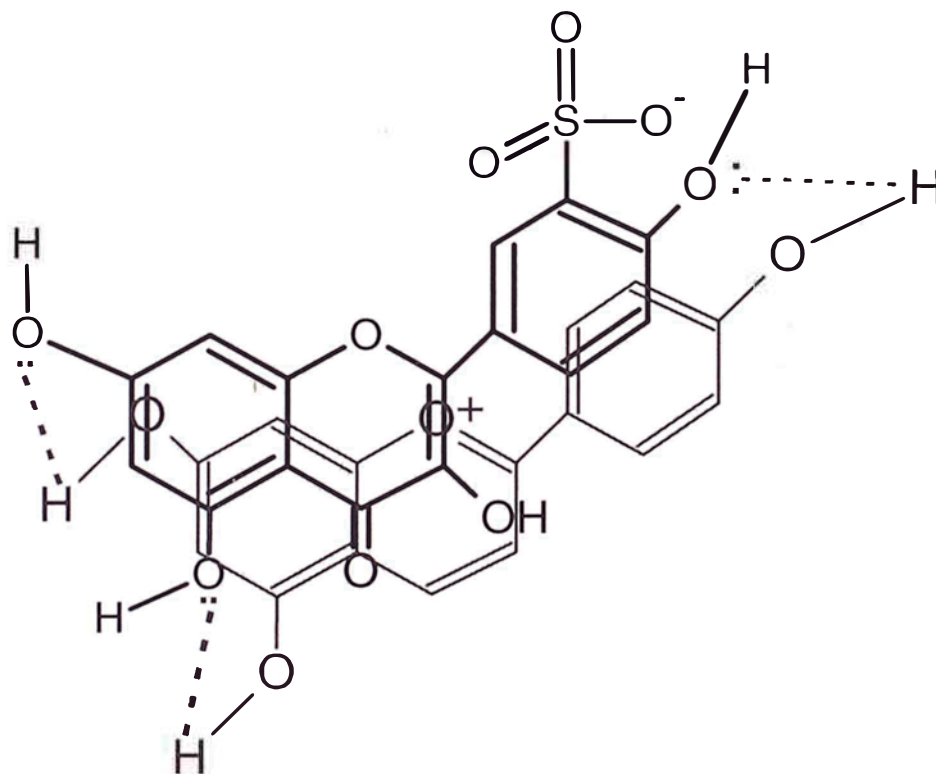


Figura N°2.54.-Representación del complejo (1:1) molecular entre la apigenidina y el ácido 5'- sulfónicoquercetina (Iacobucci y Sweeny , 1983).

Una copigmentación intermolecular (Figura N° 2.54), implica un aumento de la absorbancia en la región del visible, también puede causar un desplazamiento batocrómico en la longitud de onda de máxima absorbancia(Timberlake, 1980). El complejo probablemente dominada por las fuerzas de Van der Waals y los efectos hidrofóbicos en medio acuoso , resultan de la superposición $\pi-\pi$ entre las moléculas de antocianina y el copigmento.

La reacción de copigmentación es probablemente el principal mecanismo de

interacción molecular involucrado en las variaciones de color y de la astringencia durante la producción y el envejecimiento del vino (90).

La formación del complejo es dependiente de la concentración del copigmento y de la de la antocianina. Según, Asen et al., a medida que se aumenta la relación de concentración de copigmento / antocianina, aumenta la absorbancia de la muestra e induce a un desplazamiento batocrómico, en λ_{max} , con un aumento sensible en la estabilidad de la antocianina.

Tabla N° 2.1.- Valores de $Kh_{-1} \cdot 10^{-2}$ y $t_{1/2} \cdot 10^{-2}$ (horas) para soluciones de antocianinas puras (ACY) y soluciones de antocianinas con ácido tánico (AT) a pH = 2, 3, 4, y el efecto de luz(126).

pH	AT + ACY		ACY
2	K	0,0931	0,4945
	t_{1/2}	7,44	1,40
3	K	0,3322	0,6632
	t_{1/2}	2,09	1,04
4	K	0,7673	1,1307
	t_{1/2}	0,9	0,61

La Tabla N° 2.1 muestra el efecto del ácido tánico, sobre la copigmentación de las antocianinas a diferentes pH. Se observa los valores de $t_{1/2}$ es 5 veces mayor para las antocianinas copigmentadas a pH = 2 y esta relación decrece a medida que se eleva el pH de 2 a 4. Este hecho comprueba la importancia del pH en la formación y la estabilidad del complejo antociánico-copigmento.

Tabla N°2.2.- Valores de $Kh_{-1} \cdot 10^{-2}$ y $t_{1/2} \cdot 10^{-2}$ (horas) para las fracciones purificadas de antocianinas (Acy) a pH = 2, 3, 4 y el efecto de luz. El grado de purificación de la Fracción 3 > fracción 2 > fracción 1. (126)

pH		fracción1	fracción2	fracción 3
2	K	0,0969	0,5040	1,6202
	$t_{1/2}$	7,15	1,37	0,43
3	K	0,4777	1,2085	3,0737
	$t_{1/2}$	1,45	0,57	0,23
4	K	0,7727	1,805	2,7886
	$t_{1/2}$	0,90	0,38	0,25

En la Tabla N° 2.2 se observa un comportamiento de diferentes fracciones de antocianinas extraídas de la inflorescencia de capim gordura (Melinis minutiflora) en función de la presencia de copigmentos naturales (flavonoides). A medida que se purifican más las fracciones de antocianina, se reduce la presencia flavonoides naturales en el extracto y, consecuentemente, se eleva la susceptibilidad de las antocianinas a los efectos de la luz, indicando que la descomposición es mayor cuánto mayor es el grado de purificación de los pigmentos, lo que puede ser observado en dicho cuadro.

D.- EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN

1.- Extracción

a) Introducción

La extracción de antocianinas es necesariamente el primer paso en la purificación, y procesamiento de las mismas. El método de extracción debería ser tal que la máxima cantidad de antocianinas sea recuperada, con una mínima cantidad de otros productos no deseados. Esto se alcanza usualmente mediante la extracción del material vegetal con HCl 1 % en metanol, durante 24 horas y el extracto obtenido se concentra al vacío a una temperatura menor de 40°C. Si la antocianina va a ser destinada a la industria de los alimentos se prefiere usar etanol-HCl 1 % que no es tóxico, es más económico y su poder extractivo es casi tan bueno como la del metanol. La inclusión del agua ayuda a la extracción especialmente de antocianinas hidrofílicas y el HCl estabiliza el pigmento y baja el pH hasta un nivel donde de la antocianina alcanza su máxima absorbancia.

b) Evaluación del procedimiento de extracción

La evaluación del procedimiento de extracción (101) se realizaron con bayas de arándalo (cranberry) y se procedió de la siguiente manera: 100 gramos de bayas de arándalo estrujadas fueron mezclados con 100 ml de solvente extractor, EtOH-HCl 1,5 N, en una proporción volumétrica(85:15) con un agitador magnético a toda velocidad, durante 1 hora. La muestra se transfiere a un vaso de 400 ml usando 50 ml del solvente extractor para el lavado del recipiente. El vaso con el macerado se cubrió con un plástico y se almacenó durante una noche a 4°C. El extracto se filtró con papel wathman N° 1, obteniéndose aproximadamente 215 ml de solución, los cuales se enrrasaron en una fiola de 250 ml(**rotular A:** extracto de la primera corrida). El vaso con los residuos fueron lavados repetidamente con el solvente extractor hasta obtener otros 215 ml y se enrrasó cuantitativamente en una fiola

a 250 ml (**rotular B**: Extractos del primer lavado). Una tercera fracción llamada «*lavados secundarios*» fueron obtenidos mediante el lavado del residuo con 85 ml del solvente extractor y se enrrasó cuantitativamente a 100 ml (**rotular C**: lavados secundarios).

Para la evaluación de eficiencia de extracción, se trabajaron con 6 muestras de arándalo y la cantidad de antocianinas totales presentes en cada fracción fue determinada usando el método descrito por Fuleki, llegando a los siguientes resultados.

Tabla N° 2.3.- Recuperación de antocianinas totales del arándalo extracción con EtOH - HCl 1,5N (85 - 15)

Código	Fracción		Recuperación de Acy T	
	Nombre	Volumen	mg / 100 g	%Acy T
A	Primer extracto	250 ml	48,04 ± 0,59 ¹	86,02 %
B	Primer lavado	250 ml	7,81 ± 0,53	13,98 %
	Total A y B	500 ml	55,85 ± 0,77	100 %
C	Segundo lavado	100 ml	0,11	0,2 %

1 Error estándar de la media

De la evaluación del método de extracción se puede concluir que la mayor parte de las antocianinas fueron extraídas en los primeros 250 ml del solvente extractor. En el lavado de los residuos con una porción adicional de 250 ml del solvente extractante se removió prácticamente toda la antocianina.

2.- Purificación

Se han descrito varios métodos de purificación de antocianinas en la literatura, tal como la extracción por solventes, precipitación con acetato de plomo, cinc, mercurio, etc, resinas de intercambio iónico, columnas de celulosa microcristalina y/o poliamida, para la

purificación de los extractos que contiene altas proporciones de azúcar y de otros metabolitos que no poseen carga en el medio de extracción. Desde que ninguno de estos métodos fue usado anteriormente para el análisis cuantitativo de los pigmentos individuales, es necesario evaluar los métodos más representativos: precipitación con acetato de plomo, columnas cromatográficas de intercambio iónico y columnas cromatográficas de poliamida.

a) **Precipitación con acetato de plomo**

La precipitación de antocianinas (Acy) con acetato de plomo es el método más antiguo para la separación de las Acy a partir de las plantas que lo contienen (102) y todavía es usado frecuentemente para la purificación preliminar y concentración de antocianinas. Varias sales o pseudo-sales de plomo divalentes han sido usadas para la precipitación de Acys. Una solución acuosa o alcohólica de acetato de plomo neutro, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ generalmente es usado. Soluciones de otras sales básicas, subacetato de plomo (acetato básico de plomo), $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$, y en menor proporción otros compuestos de plomo como el nitrato de plomo, hidróxido de plomo también han sido usados.

Las antocianinas no sólo son un grupo de compuestos presentes en los extractos de plantas los cuales son capaces de formar sales de plomo poco solubles. Los grupos que poseen un grupo carboxilo libre (ácidos orgánicos, fenoles, ácidos grasos, aminoácidos y proteínas) u otros grupos nucleofílicos tales como los flavonoides, taninos, etc son precipitados también por el acetato de plomo. Desde que el acetato de plomo puede precipitar numerosos constituyentes de las plantas además de las antocianinas, este método no es conveniente para la purificación absoluta de Acy. Sin embargo, es adecuado para una purificación preliminar de las Acys presentes en la solución acuosa o en extracto alcohólico, porque las impurezas importantes y abundantes es el azúcar, el cual no precipita con este reactivo.

Además de la purificación preliminar de Acys presentes este método transfiere la Acy

de la solución acuosa, al solvente alcohólico y la antocianina es concentrada a menor temperatura y usando una mínima cantidad de alcohol y HCl o H_2SO_4 , para liberar los pigmentos de sus sales de plomo. El precipitado de la sal de plomo formado en la adición del correspondiente ácido es separado por centrifugación. El ácido acético no es usado para la regeneración de Acy a partir de la sal de plomo porque se forma acetato de plomo que es poco soluble en alcohol pero soluble en solución acuosa. La presencia de acetato de plomo en la solución de antocianina podría interferir posteriormente en el análisis de la muestra.

La reacción entre en plomo y la Acy no está aun bien comprendida. En contraste con los quelatos de Al^{+3} , Fe^{+2} de alta solubilidad y más estables donde están involucrados enlaces covalentes entre metal y los grupos o-dihidroxisilos. Los enlaces químicos entre el catión metálico pesado y el grupo nucleofílico hidroxílico es esencialmente de naturaleza iónica. Debido al carácter anfotérico de la Acy, la reacción entre el Pb^{+2} y la Acy es función del pH.

Desde que el pH óptimo para la formación del precipitado es diferente para varios Acys, se podría usar la precipitación fraccionada para la separación de algunas antocianinas individuales (103). Por ejemplo, En el análisis de uva y vinos, los métodos más usados emplean precipitación fraccionada de Acys, usando tanto acetato básico de plomo seguido de acetato de plomo neutro o acetato de plomo neutro y ajustando el pH durante la precipitación

De acuerdo con Geissman (1955) y Hayashi (1962) la presencia de grupos hidroxilo adyacentes en la molécula de antocianina es favorable para la formación de sales plomo insolubles. En consecuencia, glicósidos de la cianidina, delphinidina y petunidina son precipitados a pH bajos en comparación con la pelargonidina, peonidina o malvidina. Esto indica que el grupo fenólico de Acy contienen grupos HO libres y son más ácidos que aquellos que carecen de tales OH fenólicos libres. Esta diferencia en la reactividad entre Acys es utilizada para propósitos de identificación usando acetato de plomo como reactivo cromogénico.

Considerando la inestabilidad de Acys en medio alcalino no es conveniente incremen-

tar el pH a niveles elevados o el uso de acetato de plomo básico de acuerdo a Sengewald (1961) el acetato de plomo puede causar alguna degradación de Acys, particularmente cuando el medio no es tan ácido. Sin embargo, se encontró que el error medio en la recuperación de antocianidina sintética añadido a los vinos tintos fue solo 4 % (Rando 1,45 - 15,5) después de un tratamiento con acetato de plomo básico Sengewald (1961) reportó 92,5 % de Acys a partir de vino tinto híbrido después de usar acetato de plomo neutro y amoníaco para precipitar los pigmentos. Somer (1966) encontró que el malvidin-3-glucósido y los pigmentos acilados fueron sólo parcialmente precipitados a partir de la uva por acetato de plomo y en la peonidina-3-glucósido del todo. Alguna pérdida de los pigmentos acilados lábiles ocurre cuando la precipitación fue llevado a cabo con acetato de plomo básico. (Somers 1966) o en medio débilmente básico (Ribéreau-Gayon 1959). El almacenamiento de los pigmentos en forma de complejo de plomo resultó en una pérdida completa de las antocianinas aciladas.

Deibner et al. (1963) estudiaron el método de la precipitación con acetato de plomo usando vinos tintos y soluciones de malvina, peonina y oenina. Ellos mostraron que la adición de acetato de plomo básico sólo o con el subsecuente ajuste del pH fue insuficiente para precipitar la Acy completamente. Los autores indicaron que no solo cambios cuantitativos sino cambios cualitativos en composición Acy pueden ocurrir como resultado de la precipitación de acetato de plomo.

b) Cromatografía de columna con poliamida

En comparación con otros flavonoides, relativamente poco uso se ha hecho de este nuevo adsorbente en el análisis de Acys. Chandler et al (104) encontraron que las antocianinas y antocianidinas fueron retenidas débilmente en la columna de poliamida y comienza fácilmente a eluir por el uso de solventes suficientemente ácidos para prevenir la descomposición de los pigmentos. La Acy fue cuidadosamente separada a partir de otros flavonoides los cuales fueron firmemente retenidos. Las poliamidas han sido usadas para la purificación

preliminar de las Acys del arándalo (Zapsalis et al., 1965) encontró que la polivinilpirrolidona es preferible a la poliamida para la purificación de las antocianinas.

c) **Cromatografía de intercambio iónico**

De acuerdo con Seikel (1962) y Ice et al. (1951) sugirieron por primera vez el uso de resinas intercambiadoras de iones (Amberlite CG-50) para la purificación preliminar de Acys. Todos los flavonoides excepto las chalconas son absorbidos a partir de las soluciones acuosas por la resina (Amberlite IRC-50). La mayoría de las impurezas orgánicas e inorgánicas solubles en agua pueden ser removidos por lavados con agua. Los glicósidos pueden ser removidos por soluciones ácidas de agua-alcohol y las agliconas con alcohol al 95 %.

El mecanismo de absorción no es del todo claro. Boardman (1957) indicó que varios tipos de resinas intercambiadoras se comportan de manera diferente. Sustancias aromáticas iónicas puede ser fuertemente absorbidas sobre el poliestireno y pueden mostrar baja absorción sobre resinas ácido polimetacrílico ionizados o intercambiadoras de iones sobre celulosa. Los grupos carboxilo de las resinas de ácido poliacrílico permanecer inalterados por debajo de $\text{pH} = 5$ y pueden unir sustancias polares por enlaces polares. Este principio es realmente la cromatografía de adsorción en las resinas de intercambio iónico.

Varios tipos de resinas (Amberlite CG-50, IRC-50, IR-120, Dowex 50) han sido usados para la purificación preliminar de Acys, pero hay poca información sobre la recuperación cuantitativa de Acys a partir de columnas de intercambio iónico. De acuerdo a Kazmierczak (1966) las Acys a partir de varios jugos de bayas fueron completamente absorbidos sobre columnas de Amberlite IRC-50, IR-120 y Dowex 50. Las antocianinas fueron fácilmente eluidos con alcohol etílico al 95 % en la columna de Amberlite IRC-50, pero con dificultad en las otras columnas. Sin embargo, algunos autores (Parkinson 1954, Endo 1958, Sakamura et al. 1961) notaron la elución de un color generalmente naranja o marrón-pardo ocurrió cuando la columna fue lavada con agua.

Otros métodos alternativos son mencionados en la literatura, tal como la precipitación con acetato de mercurio y cinc, extracción por solventes (Nebesky et al. 1949) columnas cromatográficas de celulosa (Daravingas et al. 1965) electroforesis (Markakis 1960). Últimamente se han reportado muy buenos resultados con HPLC en fase reversa, utilizando columnas de μ -Bondapak (C18), y solventes como: 0,1 % H_3PO_4 en HOAc:H₂O (10:90), y H₂O : HOAc: MeOH (65:15:20) ó (71:10:19). Finalmente en artículos recientes se reportan purificaciones de antocianinas por cromatografía de exclusión usando gel de Sephadex LH-20 o gel de Diaión HP-20.

E.- MÉTODOS CUANTITATIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS

1.- DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS TOTALES

a) Introducción

El método desarrollado por Fuleki et al. (94) para la determinación de antocianinas totales consiste en la extracción de antocianinas con etanol-HCl 1,5 N (85:15) y la medición de la correspondiente densidad óptica del extracto, diluido con el solvente extractor a 535 nm. El contenido de antocianinas totales fue calculado en cantidades absolutas con la ayuda de coeficientes de extinción para las cuatro antocianinas principales del arándalo disueltos en el sistema alcohólico.

La antocianinas totales pueden a menudo ser determinadas en extractos crudos que contienen otros compuestos fenólicos los cuales existen inevitablemente en la planta. La determinación se efectúa mediante la medición de la absorbancia de la solución a una determinada longitud de onda de máxima absorbancia, donde sólo absorba el pigmento deseado. Esto es posible debido a que las antocianinas tienen máxima absorbancia en la región entre 510-550 nm. (Harbone 1958), y el grupo de compuestos con máximos espectrales más cercanos a este rango son los flavonoides con absorción máxima en la región 350-380 nm.

Tal método simple y directo para la determinación de antocianinas totales fue usado en estudios previos en el arándalo, donde una porción del extracto fue diluido con el solvente extractor inicial y la absorbancia fue medida a 535 nm. El contenido de pigmento se puede expresar como el equivalente en miligramos de rojo de congo por gramo de bayas frescas mediante el uso apropiado de factores de conversión.

La λ máx. absorción y la absorptividad molar usadas en los métodos espectrofotométricos sencillos, son marcadamente afectados por el pH, presencia de ciertos metales, tiempo de reposo, temperatura, etc.. Adicionalmente, relaciones lineales entre la concentración y la absorptividad pueden ser esperados sólo a bajas concentraciones por lo que es necesario una dilución considerable.

Es deseable expresar los resultados de las determinaciones de antocianinas totales en términos tales que puedan ser comparados a los resultados obtenidos por diferentes investigadores. Sondheimer et al. (1948) sugirió que los resultados de las medidas podrían ser expresados en términos de unidades equivalentes de rojo de congo. La falla de este método es que la absorbancia del colorante varía con cada lote (Francis 1957). Otros autores han usado antocianinas disponibles comercialmente o antocianidinas para expresar sus resultados. Esta práctica podría ser también engañosa debido a las impurezas encontradas en los productos comerciales (Fuleki et al. 1967).

Tabla N° 2.4.- Coeficientes de extinción molar de antocianidinas y antocianinas reportadas en la literatura(94).

Pigmento	M**	Medio*	λ_{max}	$\epsilon_{max} \cdot 10^4$
Pelargonidina	324,5	0,1 % HCl en EtOH	504,5	1,78
Pl-3-Gl	486,5	0,1 % HCl en agua	496,0	2,73
Cianidina	340,5	0,1 N HCl en EtOH	510,5	2,46
Cy-3-Ga	502,5	0,1 % HCl en MeOH	535	4,62
Cy-3-Ar	472,5	0,1 N HCl en EtOH	538	4,44
Peonidina	354,5	0,1 % HCl en EtOH	511	3,72
Pn-3-Gl	516,5	0,1 % HCl en MeOH	536,0	1,13
Pn-3-Ga	516,5	0,1 N HCl en EtOH	532	4,84
Pn-3-Ar	486,5	0,1 N HCl en EtOH	532	4,61
Delfinidina	356,5	0,1 % HCl en EtOH	522,5	3,47
Malvinidina	400,5	0,1 % HCl en EtOH	520,0	3,72
Mv-3-Gl	562,5	0,1 % HCl en MeOH	546,0	1,39

* Las proporciones de los solventes son 0,1 % HCl en EtOH (15 : 85) ó 0,1 N HCl en EtOH (15 : 85)

** M : Peso molecular . Ya que las determinaciones fueron llevados a cabo en HCl acuoso, el peso molecular de los cloruros de antocianina o antocianidina incluye el agua de cristalización.

El mejor camino para expresar los resultados de la determinación de antocianinas totales es en términos de las cantidades absolutas de antocianinas presentes en una mezcla en particular. Para este fin, no sólo es necesario establecer la identidad de los pigmentos sino también su coeficiente de extinción (E) en el solvente usado. Es suficiente establecer el valor de E sólo una vez pero la aplicación de éste método se dificulta por la falta de concordancia entre los valores reportados de E en la literatura . Esta falta de uniformidad es comprensible si consideramos la dificultad de preparar cristales de antocianinas, libres de impurezas, en suficiente cantidad para permitir algunas pesadas bajo condiciones óptimas.

Las antocianinas son bastante inestables, particularmente en la forma pura, y están a menudo contaminadas con sus productos de degradación polimérica. La presencia de impurezas, en muchos casos podrían resultar en una reducción del valor E. En adición, a estos factores, la absorbancia de la molécula de antocianina también depende del pH y de la naturaleza del medio. La disminución del pH y/o uso de un medio alcohólico apreciable-

mente aumenta el valor de E de las antocianinas.

Las principales antocianinas del arándalo fueron identificadas por Sakamura et al. (1961) y Zapsalis et al. (1965) como: cianidina-3-galactósido (Cy. 3-Ga), cianidina-3-arabinósido (Cy. 3-Ar), peonidina-3-galactósido (Pn. 3-Ga) y peonidina-3-arabinósido (Pn. 3-Ar). Los valores del coeficiente de extinción fueron establecidos por Zapsalis en pigmentos recién preparados y altamente purificados disueltos en etanol-HCl 0,1 N (85-15)

Una comparación de los valores de « E » muestran que los valores del coeficiente de extinción más altos fueron obtenidos por Zapsalis. Esto y el hecho que todas las antocianinas fueron obtenidas en forma cristalina, indica que estos valores son probablemente de alta confiabilidad.

Un medio apropiado se utilizó como blancos en la determinación de los valores de E . Para el análisis de rutina, se utilizó agua destilada como blanco después de establecer que no existía diferencia de absorción en la región espectral de 250-650 nm entre el agua y el medio usado en la determinación de antocianinas totales.

b) Establecimientos de coeficientes extinción

Los valores de E obtenidos por Zapsalis fueron usados como una base para establecer los valores de E para las antocianinas del arándalo disueltas en el medio usado en la determinación de antocianinas totales. Las antocianinas individuales purificadas fueron obtenidas en forma de una solución concentrada de MAW, a partir del cual la purificación final se realizó por cromatografía de papel. La solución stock de antocianinas individuales fueron acidificados con unas cuantas gotas de HCl 4N en etanol, y una alícuota de 1 ml fue diluido a 25 ml usando una fiola. Después de permanecer 2 horas en reposo en la oscuridad, se midió la densidad óptica de la solución por triplicado a la λ_{max} .

Ya que la concentración de los pigmentos fue la misma en el solvente de extracción original (standard) para los cuales los coeficientes de extinción eran conocidos, mientras que los de la muestra no se conocía, la diferencia entre las densidades ópticas podría ser relacionada con la diferencia de absorbancias según:

$$E_{(1\% \text{ para } 1\text{cm de muestra})} = \frac{\text{O. D. de la muestra}}{\text{O.D. estándar}} E_{(1\% \text{ para } 1\text{ cm de estándar})}$$

Los coeficientes de extinción medidos a 535 nm fueron establecidos para los cuatro pigmentos sobre nuestras por triplicado.

c) **Discusión de resultados**

i Mediciones de Absorbancia

Las mediciones de densidad óptica (D.O.) para la determinación de Acy totales fueron llevados a cabo en el solvente extractante. Este medio etanólico dio una solución diluida de Acy, y ajustada a un pH = 1 se dejó en reposo por un periodo de 2 horas para dejar alcanzar el equilibrio entre las diferentes formas de Acy presentes a pH = 1. Las mediciones de D.O. fueron realizados a 535 nm.

ii Coeficiente de extinción.

Ya que los valores de **E** para la Acy del arándalo fueron conocidos solo para el solvente extractante original fue necesario establecer valores de **E** para el EtOH - HCl 1,5N (tabla N°2), en medio etanólico el pico de absorción en rango visible esta entre 535 y 536 nm para las cianidinas y 532 para la peonidina glicosídica. En la región UV el pico de máxima absorbancia fue encontrado a 281 - 282 nm para todos los pigmentos. Estos valores coinciden cercanamente con aquellos reportados en la literatura para estos pigmentos.

Tabla N° 2.5.- Coeficientes de extinción de las antocianinas del arándalo en medio alcohólico(94).

Pigmento	EtOH - 0,1N HCl (85:15)				EtOH- 1,5N HCl (85:15)			
	λ_1	$E^{1\%}$ (nm)	λ_2	$E^{1\%}$ (nm)	λ_1	$E^{1\%}$ (nm)	λ_2	$E^{1\%}$ (nm)
Cy-3-Ga	535	920	281	432	536	958	282	484
Cy-3-Ar	535	941	281	428	535	1002	282	421
Pn-3-Ga	531	936	281	427	532	987	282	450
Pn-3-Ar	532	947	281	450	532	981	282	470
Promedio					982			

El valor de **E** a 535 nm fue usado en el cálculo del contenido de Acy T. Desde que las diferencias entre los valores de **E** de las 4 Acy del arándalo fueron ligeramente pequeñas y la razón de antocianinas individuales no fue generalmente conocido, el valor de **E** promedio de las 4 Acy principales(**982**) puede ser usado para calcular Acy T. El uso de una valor medio ligeramente menor que el promedio ponderado puede resultar un error menor de 0,2 % para la proporción de los pigmentos en arándalo.

iii Cálculo del contenido de antocianinas totales.

La D.O. total (TOD) es calculado antes que D.O. en pequeñas alícuotas del extracto diluido, para que pueda ser corregido para cierta cantidad de bayas (por ejemplo, 100 g).

El TOD obtenido es transformado en miligramos de Acy con la ayuda del valor de E.

El TOD' para 100 ml de extracto es calculado usando la siguiente ecuación:

$$\boxed{\text{TOD}' = \text{D.O.} \times \text{DV} \times \text{VF}} \quad (1)$$

Donde :

D.O.: absorbancia leída sobre la muestra diluida ($l = 1 \text{ cm}$)

DV: Volumen diluido o el volumen en ml del extracto diluido preparado para la medición de

D.O.

VF: Factor de corrección del volumen, el cual corrige la diferencia entre los 100 ml, el volumen original (OV) para el cual los cálculos son hechos y el volumen de la muestra (SV) o el volumen del extracto usado para la medición de la absorbancia.

$$VF = \frac{OV}{SV} = \frac{100}{SV}$$

Ya que se desea determinar el TOD para 100 g de bayas de arándalo. El TOD' calculado para 100 ml de extracto podría ser usado para efectuar la conversión.

$$\text{TOD (por 100 g)} = \text{TOD' (por 100 ml de extracto)} \cdot \text{TEV} / \text{W Cr} \quad (2)$$

Donde:

TEV: Volumen total del extracto. El volumen total de extracto en ml obtenido a partir de la muestra de arándalo usado en la extracción.

WCr: Masa de arándalo en gramos usado en la extracción.

El valor de TOD da la absorbancia como si todo Acy presente en el arándalo fuera concentrado a 1 ml de solución. Ya que es más conveniente calcular la Acy en miligramos, mientras que los valores de E promedio fueron dados para una solución 1% (10 mg/ml), el valor de «E/10» tiene que ser usado para el cálculo de las antocianinas totales (Acy T). La Acy T en miligramo por 100 g de extracto inicial de arándalo es calculado a partir de TOD usando:

$$E^{1\%} (535 \text{ nm}) = 982 \quad (\text{valor promedio para las Acys del arándalo}), l = 1 \text{ cm}$$

$$\text{mg Acy T} / 100 \text{ g} = \frac{\text{TOD}}{E_{535 \text{ nm}}^{1\%} \cdot l = 1 \text{ cm}}$$

$$\text{mg Acy T} / 100 \text{ g} = \frac{\text{TOD}}{98.2} \quad (3)$$

La fórmula anterior se reduce a:

$$\text{mg Acy T / 100 g} = \frac{\text{DO} \cdot \text{DV} \cdot 100}{\text{SV} \cdot \text{WCr}} \cdot \frac{\text{TEV}}{98,2} \quad (4)$$

Ejemplo : Para facilitar el cálculo de las Acy T se da un ejemplo. El volumen total del extracto obtenido a partir de 100 g de (W Cr) de fruto fresco fue 500 ml (TEW). Una muestra de 2 ml (SV) del extracto fue diluido con el solvente extractor a 100 ml (DV) y la densidad óptica (D.O.) medida a 535 nm fue 0,400. La Acy T contenida podría ser calculado en **mg / 100 g Cr**.

La TOD´ para 100 ml de extracto calculado :

$$(1) \text{ TOD}' = 0,400 \cdot 100 \cdot 100 / 2 = 2000$$

La TOD para 100 g de frutos de arándalo calculado es :

$$(2) \text{ TOD por 100 g de Cr} = 2000 \times 500 / 100 = 10000$$

La Acy T contenida es calculado con la ayuda del E apropiado .

$$(3) \text{ Acy T} = 10000 / 98,2 = 101,7 \text{ mg / 100 g Cr}$$

Los datos presentados en la Tabla N^o2.5 muestra las diferencias en el valor de E de Antocianinas del arándalo. Aunque estas diferencias son despreciables para los trabajos en general, se hacen importantes en casos de que se desee elevada precisión, como por ejemplo, los estudios de biosíntesis. En tales casos, la cantidad de cualquiera de las antocianinas presentes podría ser determinada usando el método de cálculo empleado aproximaciones sucesivas como es descrito en artículos posteriores, de esta serie. La suma de las cantidades determinadas para las Acys individuales podría dar antocianinas totales . La gran diferencia entre los valores de E de Acys que se presentan en las plantas, (por ejemplo, los mono y diglicósidos) deben ser minimizados por los cálculos con el coeficiente de extinción molar (ϵ).

iv Método de Evaluación de Antocianinas Totales .

La precisión del método fue evaluado por el análisis de 10 alícuotas idénticas del mismo extracto de Cr. La variación que fue encontrada esta dentro de los niveles aceptables de error (coeficiente de variabilidad del 1,4 %).

El método de extracción y determinación de Acy T desarrollado para el arándalo puede ser usado para otras plantas, y productos sólidos o semisólidos que contengan Acy. Con muestras que contienen clorofila el método para la determinación de Acy T puede ser aplicado después de efectuar lavados del extracto con éter etílico para remover la clorofila. Para otras plantas cuyo E del pigmento no está disponible se presenta un problema especial: Si los coeficientes de absorción no pueden ser determinados, entonces la mejor aproximación es el cálculo de Acy T contenido usando los valores de E establecidos para Acys del arándalo. El error introducido por esta sustitución podría variar de acuerdo al tipo de pigmento presente pero puede ser abandonado cuando se tenga los estudios comparativos de mayor precisión.

2.- Determinación del índice de degradación

El análisis de antocianinas totales en jugos u otros productos guardados largos intervalos de tiempo introduce el problema de que no se puede aplicar las técnicas normales de determinación de Acy T, debido a que en dicho intervalo de tiempo una cantidad considerable de Acy se ha degradado a un producto de color parduzco. Aunque este producto de degradación tiene su máximo de absorción alrededor de 415 nm (Ponting et al. 1960), ellos también absorben en 510 nm, longitud de onda donde se realiza la determinación de Acy T y se pueden introducir errores si se efectúa la determinación directa de Acy T bajo estas condiciones. Fuleki et al. (105), usando el método del pH diferencial y el pH único han logrado determinar los índices de degradación en extractos de antocianinas que han sido sometidos a un proceso y/o han sido guardados por largo tiempo.

Para una determinación de antocianinas individuales a partir de sus extractos se puede

buscar mayor información en los trabajos de Fuleki et al. (106).

F.- IDENTIFICACIÓN DE ANTOCIANIDINAS Y ANTOCIANINAS

1.- Identificación por cromatografía de papel

Muchas veces, de acuerdo a la experiencia del investigador, se pueden indentificar las antocianinas o antocianidinas por comparación de Rf en la cromatografía de papel, de los pigmentos estudiados, con los estándares de los mismos. En las siguientes publicaciones se encuentra detalles sobre la cromatografía de papel de antocianinas y antocianidinas(95 - 97).

Bate-Smith y Westall (98) estudiaron el comportamiento sobre el papel de un gran número de polifenoles simples y de compuestos naturales y sintéticos de 15 átomos de carbono y demostraron que los valores de Rf están relacionados con la naturaleza y número de grupos sustituyentes, de tal manera que en muchos casos se puede obtener una línea recta cuando se representa en un gráfico el « $\log (1 / R_f - 1)$ con el número de sustituyentes de cualquier clase». De se puede deducir la relación existente entre la estructura y el coeficiente de partición. En algunos casos, el incumplimiento de esta relación puede atribuirse a factores constitucionales y especialmente a reordenamientos de tipo orto, o bien vecinal, de los grupos sustituyentes.

La cromatografía de papel suele desarrollarse sobre papel whatman N°1 ó N°3, utilizando una serie de eluentes, destacando entre los más comunes:

BAW : n.butanol : ácido acético glacial : agua, 4 : 1 : 5, fase superior

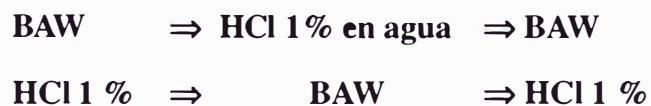
Bu:HCl : n-butanol : HCl 2N, 1 : 1, fase superior

Fórmico : ácido fórmico : HCl conc : agua, 5 : 5 : 3

Forestal : Ácido acético glacial : HCl conc : agua, 30 : 3 : 10

En general, los sistemas de solventes pueden clasificarse en dos grupos principales, los acuosos y los oleosos (aceitosos), requiriendo menor tiempo de desarrollo los prime-

ros. Es conveniente alternar ambos sistemas acuosos y oleosos, para lograr una mejor separación, a continuación se sugiere las siguientes secuencias(100):



Las bandas de antocianinas, luego de secadas se elúen del papel con metanol: ac. acético: agua, (MAW) y generalmente se requieren tres separaciones cromatográficas para obtener la antocianina lo suficientemente pura para el análisis de la aglicona y del correspondiente azúcar.

Para determinar la antocianidina y el azúcar de una antocianina es necesario hidrolizarla, para ello, se coloca en un tubo de ensayo 1 mg de pigmento, se disuelve en 2 ml de metanol, se agrega 2 ml de HCl 2 N y se coloca el tubo en un baño maría a ebullición por 30 minutos. Después de enfriar, la aglicona se extrae por adición de 1 ml de alcohol amílico y agitación, se retira la capa superior del alcohol amílico, se lleva a sequedad, se redissuelve en metanol y se cromatografía en papel whatman N°1, comparando con estándares de agliconas de referencia, pelargonidina, cianidina, peonidina, malvidina, petunidina, delfinidina y usando sistemas de elución como fórmico y forestal por 4 - 8 horas.

La solución acuosa remanente después de retirar el alcohol amílico contiene los azúcares. El HCl remanente en esta solución acuosa interfiere en la determinación del azúcar, por lo que hay que removerlo, para ello se hace sucesivos lavados con solución al 10 % de dioctilmetilamina en CHCl_3 , (las trazas de amina también deben ser eliminadas con lavados sucesivos de CHCl_3), la solución de azúcar se seca, se le agrega 2 gotas de agua para disolver nuevamente el azúcar y se cromatografía en papel Whatman N°1 utilizando patrones de glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa y ramnosa, en n-butanol:benceno: piridina y agua (5 : 1 : 3 : 3) y fenol. El revelado puede hacerse con el ftalato ácido de anilina, después aspersionarse debe secar y calentar a 105°C por dos o tres minutos, Los azúcares muestran manchas rojizas o marrones bajo la luz visible o UV.

Algunos valores característicos para antocianidinas y antocianinas se dan en la tabla N° 2.6 y N° 2.7, valores más completos se reportan en las referencias (99, 100).

Tabla N° 2.6.- Propiedades de las antocianidinas comunes(23)

Antocianidina	R _f x100			color visible	λ_{max} (nm) en MeOH-HCl
	Forestal	Fórmico	BAW		
Pelargonidina	68	33	80	Rojo	530
Cianidina	49	-	68	magenta	535
Peonidina	63	30	71	magenta	532
Delfinidina	32	13	42	púrpura	546
Petunidina	46	20	52	púrpura	543
Malvidina	60	27	58	púrpura	542

Tabla N° 2.7.- Propiedades de las antocianinas comunes(23)

Antocianina	Rfx100				λ_{max} , nm en MeOH-HCl
	Forestal	Fórmico	BAW	HCl 1 %	
Pelargonidin-					
3-glucósido	44	38	35	14	506
3,5-diglucósido	31	14	45	23	504
5-glucósido	51	49	57	18	513
7-glucósido	46	51	-	15	508
3,7-diglucósido	30	10	70	38	497
Cianidin-					
3-glucósido	38	25	42	07	523
3,5-diglucósido	28	06	40	16	522
3-galactósido	37	24	26	07	-
Malvidin-					
3-glucósido	38	15	29	06	534
3-galactósido	36	15	29	06	
3,7-diglucósido	31	03	61	34	
Delfinidin-					
3-glucósido	26	11	18	03	534
3-galactósido	23	11	18	03	
3,7-diglucósido	15	03	32	08	

2.- Espectroscopia ultravioleta-visible, UV

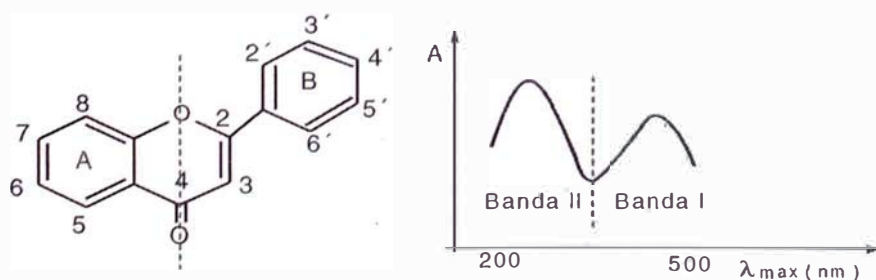
a) **Introducción**

Las antocianinas son indentificadas principalmente por sus propiedades de absorción en la región UV-visible. Las antocianinas en solución ácida (0.1 % HCl-MeOH), tienen dos máximos de absorción principales, uno en la región visible entre 465 y 550 nm , otro más en el UV, alrededor de los 275 nm; y las antocianinas aciladas exhiben una absorción débil adicional entre 310 y 335 nm, rango en el que puede determinarse el tipo de acilación aromática involucrada. Es también útil determinar la relación de absorción a 440 nm a la absorción a λ_{max} (entre 500-540 nm), ésta es usualmente alrededor de **24** para derivados de la cianidina sustituida en posición 3 y de **13** si están en la posición 5; para la delphinidina, las relaciones correspondientes son de **18** y **11**, respectivamente.

La glucosidación de la antocianidina en la posición C-3 generalmente resulta en un desplazamiento batocrómico de λ_{max} , mientras que la sustitución en C-5 produce un hombro en la curva de absorción a 440 nm.

b) **Identificación de antocianidinas y antocianinas por desplazamientos batocrómicos**

El uso de reactivos de desplazamiento proporciona información adicional, útil en la determinación de la estructura de los flavonoides en general.



II benzoico I cinamoilo

Figura N° 2.55.- Representación general del espectro de absorción de los flavonoides

Tabla N° 2.8.- Valor de absorción para las banda I y II de los diferentes tipos de flavonoides(23)

tipo de flavonoide	Banda II , nm	Banda I , nm
Flavonas	250-280, intensa	310-350
Flavonoles(3-OH sustituidos)	250-280, intensa	330-360
Flavonoles(3-OH libres)	250-280, intensa	350-385
Isoflavonas	245-275	310-330, hombro
Chalconas	230-270, baja intensidad	340-390, hombro
Auronas	230-270, baja intensidad	380 - 430
Antocianidinas	270 - 280	465 - 560, intensa
Antocianinas	270 - 280	465 - 560, intensa

El espectro UV-Visible de los flavonoides en metanol da información sobre el tipo de flavonoide así como el estado de oxidación. Los máximos de absorción de los flavonoides varía de acuerdo al estado de oxidación de los átomos del anillo central y según el número y posición de los sustituyentes OR, como resultado de los diferentes sistemas conjugados que se pueden generar. El empleo de reactivos de desplazamiento como el metóxido de sodio, acetato de sodio y ácido bórico produce desplazamientos de los máximos de absorción de acuerdo a la localización y naturaleza de las funciones oxigenadas.

Primer reactivo de desplazamiento: **MeOH**

MeOH + MeONa

Se obtiene el espectro del flavonoide en metanol entre 200 a 560 nm. Luego se adiciona en la misma cubeta metóxido de sodio y se obtiene nuevamente el espectro. El metóxido de sodio es una base fuerte y desprotona todos los hidroxilos libres causando un desplazamiento batocrómico en ambas bandas, Este es mayor a medida que aumenta la conjugación a través del sistema enona. La degradación del espectro con el tiempo es un buen indicador de la presencia de grupos sensibles a álcalis.

Segundo reactivo de desplazamiento : **MeOH + AlCl₃**

MeOH + AlCl₃ + HCl

Se obtiene en primer lugar el espectro en metanol, luego en metanol más cloruro de aluminio , y finalmente en metanol, cloruro de aluminio con ácido clorhídrico. El despla-

miento se basa en la formación de quelatos entre el AlCl_3 y dos grupos hidroxilos en posición orto, así como con el carbonilo en C4 y un hidroxilo libre en C5 y C3. En el primer caso el complejo formado es lábil ante la presencia de ácido, de tal modo que desaparece con la adición de HCl, no así en el segundo caso en que el complejo formado es estable no varía con la adición de ácido.

Tercer reactivo de desplazamiento : **$\text{MeOH} + \text{AcONa}$**



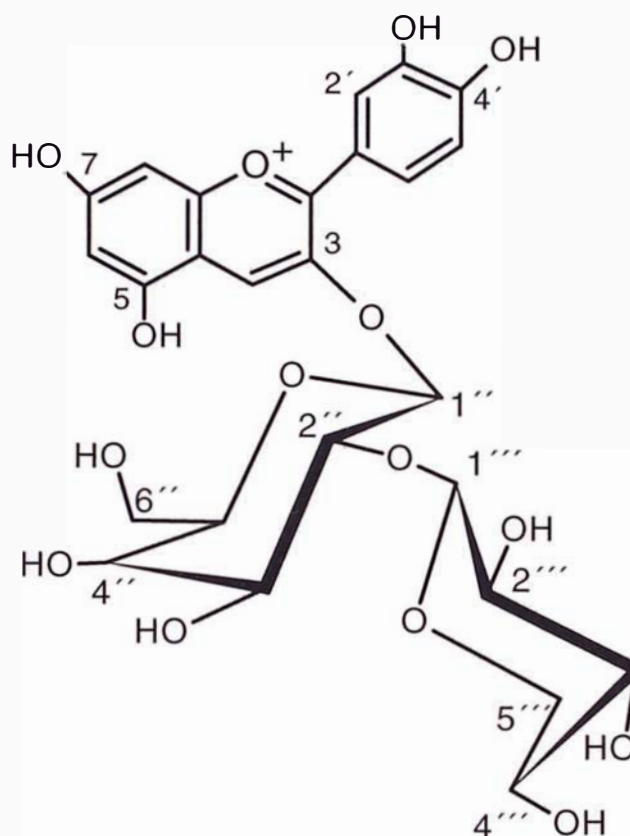
El acetato de sodio es una base débil. Se usa para detectar específicamente el hidroxilo en posición 7, observándose un efecto batocrómico importante en la banda II. Además también puede desprotonarse el protón en 3 y 4', dando los desplazamientos batocrómicos correspondientes a la banda I.

El agregar H_3BO_3 a la cubeta, se puede observar un efecto batocrómico de la banda I, si el anillo B contiene β -dihidroxilos. Esto se debe a que el ácido bórico en presencia de acetato de sodio forma un complejo con β -dihidroxilos, es decir forma diésteres con hidroxilos en posición *orto*, en general con dihidroxilos de anillo B. Además el ácido bórico puede protonar al OH y restablecer la banda II.

3.- Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ^1H , RMN- ^1H

A los inicios de la espectroscopia RMN fueron limitados los compuestos que eran solubles en los 2 únicos solventes comúnmente usados en aquellas épocas: el CD_3Cl y CCl_4 , ya que estos no presentaban señales de protones que puedan interferir con la del compuesto estudiado. Desde que las estructuras de las antocianidinas y antocianinas eran iónicas y/o altamente polares eran muy poco solubles en estos solventes y El RMN no tuvo mayor aplicación para estos compuestos. Batterham y Highet (1969), introdujeron el uso de solventes polares como el hexadeutero dimetilsulfóxido (DMSO-d_6) para los estudios de RMN, a partir de los cual se pudieron indentificar una diversidad de estructuras de antocianinas y antocianidinas (Mabry 1969, Markham 1979 y Mabry 1975). La Tabla N° 2.9 señala

características espectroscópicas para algunas antocianinas aciladas. Solamente se indican los valores de desplazamiento del protón de la aglicona, que lógicamente está afectada por los sustituyentes glicosídicos y ácidos presentes.



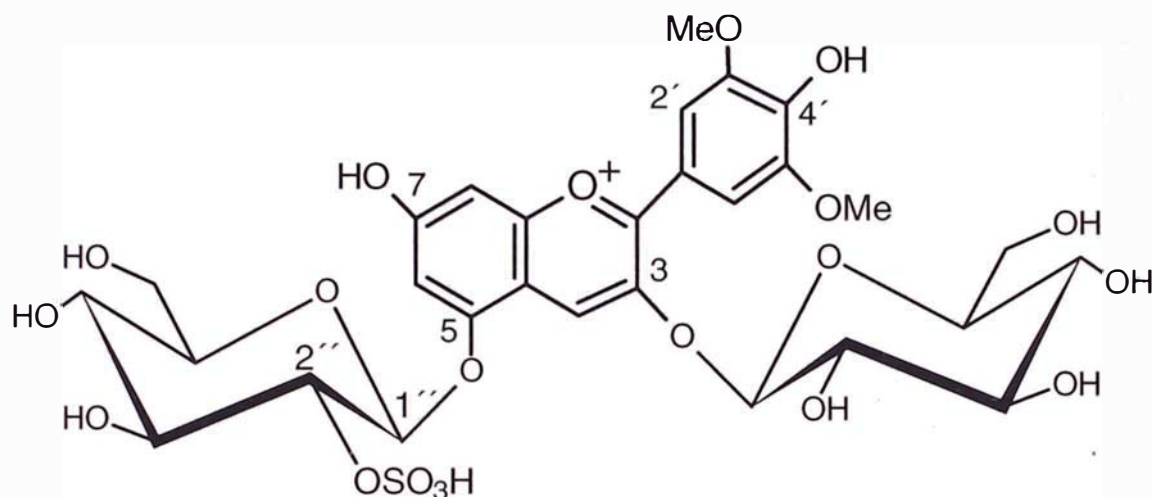
Cianidin 3-latirósido ó cianidin 3-O-(2-O-(β -xilopiranosil)- β -D-galactopiranosido
conformado por cianidina(1), xilosa(1), galactosa(1)

λ_{\max} (0,01 %HCl-MeOH) = 530 nm, 282 nm

RMN-¹H (DMSO-d₆: CF₃-COO₂D, 9 : 1), 400 MHz:

protones de la cianidina	δ (ppm)
H-4	8,81 (s)
H-6	6,69 (d, J=1,8 Hz)
H-8	6,89 (m)
H-2'	7,99 (d, J=1,8 Hz)
H-5'	7,00 (d, J=8,8 Hz)
H-6'	8,29 (dd, J= 1,8 Hz, 8,8 Hz)

Tabla N^o 2.9.- Valores espectroscópicos para algunas antocianinas aciladas(23)



Malvidin-3-glucósido-5-(2''-sulfatoglucósido), $C_{29}H_{29}O_{29}S$

Malvidin-3-O-(β -D-glucopiranosido)-5-O-(2''-sulfato- β -D-glucopiranosido)

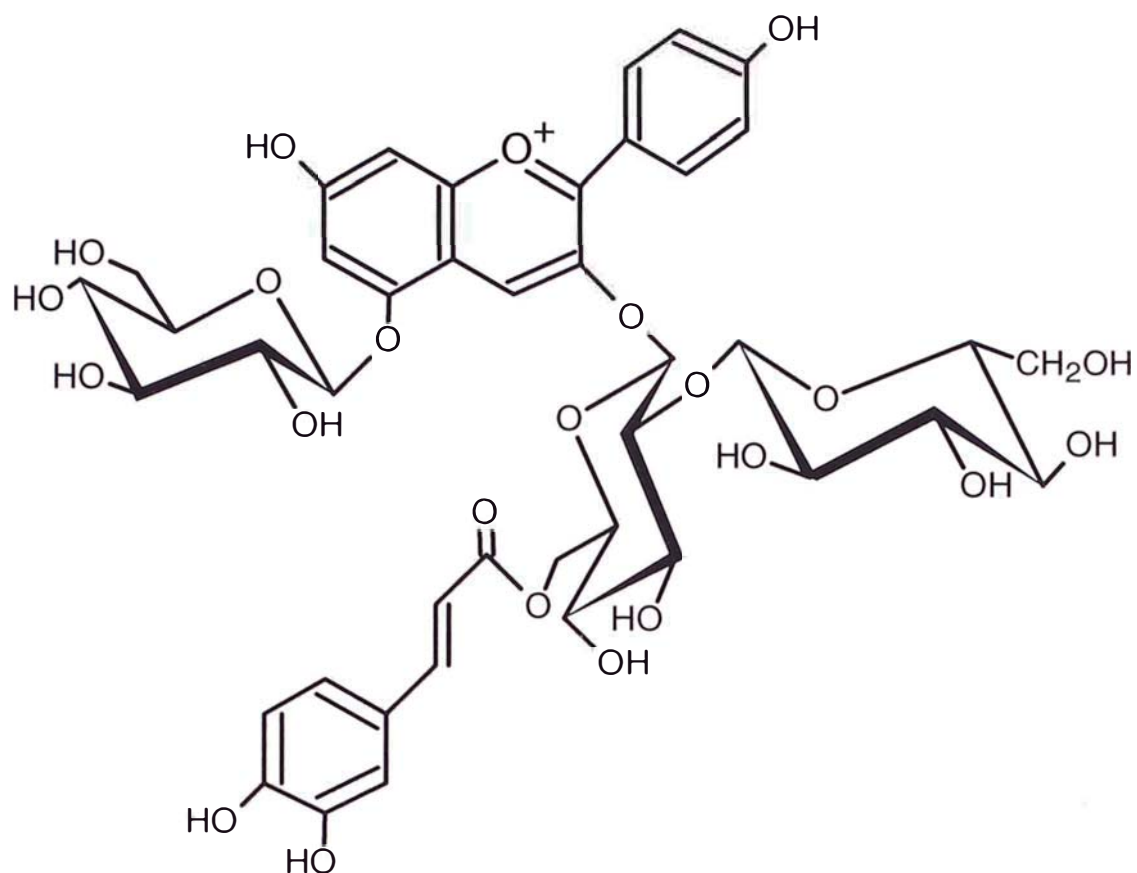
conformado por glucosa(2) + malvidina(1)

λ_{\max} (0,1 %HCl-MeOH) = 537 nm, 276 nm

RMN- 1H (TFA : DMSO- d_6 , 1 : 9), 400 MHz:

Protones de la malvidina	δ (ppm)
H-4	9,20 (s)
H-6	6,98 (d, J=2 Hz)
H-8	7,24 (d, J=2 Hz)
H-2'	7,99 (s)
H-6'	7,99
2 MeO-	3,93

Continuación de Tabla N° 2.9



pelargonidin-3-O-[(6-O-trans-cafeil-2-O-(β -D-glucopiranosil)- β -D-glucopiranosido]-5-O- β -D-glucopiranosido

conformado por : pelargonidina (1) + ácido cafeico + glucosa (3)

λ_{\max} (0,1 %HCl-MeOH) = 550, 509,331, 288 nm

RMN-1H (DMSO- d_6 : CF₃-COO₂D , 9:1), 400 MHz:

protones de la cianidina	δ (ppm)
H-4	8,81 (s)
H-6	7,07 (s.a)
H-8	6,98 (s.a)
H-2' / H-6'	8,57 (d, J=8,8 Hz)
H-3' / H-5'	7,08 (d, J=8,8 Hz)

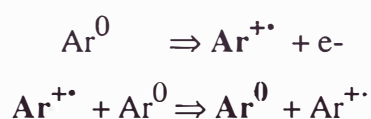
Continuación de Tabla N° 2.9

4.- Espectrometría de masa

La espectrometría de masa para el estudio de antocianinas es por bombardeo con átomos rápidos (Fast-Atom Bombardment), abreviadamente **FAB-MS** siendo sinónimo de «liquid secondary ion mass spectrometry», LSIMS.

Se trata de un método de ionización empleado para sustancias de difícil o imposible volatilización. El principio del método consiste en lanzar, átomos neutros acelerados sobre una fina película de la muestra que esta depositada en la fuente iónica del espectrómetro. De esta forma se generan iones que mediante un sistema apropiado son acelerados, enfocados y finalmente analizados.

Los átomos neutros acelerados, en general de argón y menos frecuentemente de xenón, se generan en un cañón atómico (en inglés atom gun). Para ello, en primer lugar, se producen iones Ar^{+} por transferencia de carga, que luego se aceleran (potenciales de aceleración entre 5 y 10 keV) para posteriormente ser introducidos en una cámara de colisiones donde chocan con átomos neutros de Ar. Estos choques producen un intercambio de carga sin una pérdida de sensible de energía cinética. De ello resulta una corriente de átomos Ar^0 rápidos (las partículas rápidas se indican con letra negrita en las siguientes ecuaciones):



Esta corriente atómica se hace llegar a la muestra que previamente se ha suspendido en una matriz (Generalmente glicerina) que se deposita sobre una punta plana de cobre.

Los átomos de Ar acelerados chocan con la muestra produciendo iones quasi-moleculares y fragmentos iónicos tanto de la muestra como de la matriz. Ocasionalmente también se reducen proceso pirolíticos que darán lugar a otros fragmentos. Dado que el espectro de la matriz es conocido, el análisis del espectro no presenta grandes dificultades. También se conocen interacciones matriz-sustancia y dado que dependen fuertemente de la naturaleza de la sustancia, estas interacciones no son fácilmente corregibles. Los iones $[\text{M}+\text{H}]^{+}$

y $[M+Na]^+$ son habituales en espectrometría de iones positivos, mientras que en la espectrometría de iones negativos son frecuentes los iones $[M+H]^-$. También se observan iones del tipo $[M + \text{glicerina}_n]^+$. En la determinación de la masa relativa de una sustancia desconocida es recomendable generar iones de menor masa que el ion molecular de la muestra mediante la adición de cloruro de sodio o cloruro de potasio.

5.- Espectroscopia infrarroja, IR

Muy poco uso ha tenido lugar en los últimos años la espectroscopia para el diagnóstico en la elucidación de nuevas estructuras de antocianinas. En los últimos trabajos prácticamente ninguna publicación hace referencia a esta técnica. En general, esto es porque la espectroscopía UV-Visible y/o la cromatografía de papel muchas veces son suficientes para dilucidar la estructura. Además, requiere mucho menos material y son más fáciles de realizar usando solventes polares en los cuales los flavonoides son solubles. Sin embargo, el IR es citado para confirmar la elucidación de nuevas estructuras aisladas por comparación con los estándares conocidos.

En razón a que la mayoría de las antocianinas ya han sido identificadas estructuralmente, las técnicas de IR, RMN y FAB-MS, no son muy usuales, salvo la necesidad de determinar nuevas estructuras como es el caso de las antocianinas aciladas últimamente reportadas. Debemos mencionar que con los modernos métodos de análisis por FAB-MS, puede determinarse el número, identidad y el punto de unión de los grupos acilo, conservando prácticamente la molécula intacta

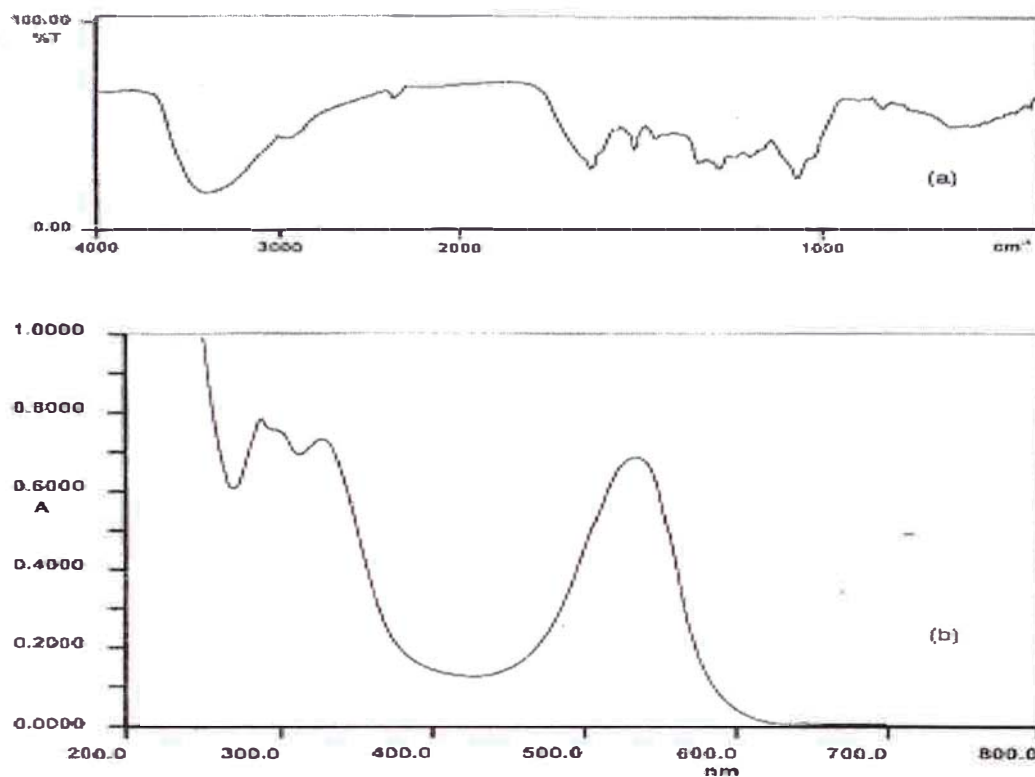


Figura N^o2.56.- Espectro Infrarrojo (a) y ultravioleta (b) de las antocianinas de la col morada(23)

6.- Aplicación de las técnicas espectroscópicas a la identificación de antocianinas del *Ranunculus asiaticus*

El *Ranunculus asiaticus*, es un planta ornamental popular, y son flores híbridas que tienen un amplio rango de colores de sus flores (blanco, amarillo, anaranjado, rojo, rosado y rojo-púrpura). T. Kenjiro et al. ([107](#)) iniciaron una investigación sobre las antocianina presentes en los cultivos de estas flores y encontraron dos nuevas antocianinas aciladas junto con otras ya conocidas. Usaremos este reporte para interpretar la elucidación estructural de las antocianinas encontradas.

T. Kenjiro y colaboradores separaron 4 antocianinas, 1 - 4, a partir de los pétalos de

flores rosadas y púrpura de *R. asiaticus* cv. «Wander Land» a partir de Aya Engei Co, Aya-Cho, Miyazaki. Los pétalos frescos fueron colocados y secados en aire a 45 °C. Los pétalos secos fueron extraídos con AcOH 5 % a temperatura ambiente durante toda la noche. El extracto filtrado fue absorbido sobre una columna de Diaion HP-20, lavado con AcOH 1 % y eluido con AcOH-MeOH-H₂O (1 : 14 : 6). El extracto fue colectado y fraccionado por cromatografía de exclusión sobre Sephadex LH-20 utilizando como fase eluente:

AcOH-ETOH-H₂O (1 : 6 : 12). Las fracciones conteniendo las antocianinas fueron además purificadas por cromatografía de papel (n-buOH-AcOH-H₂O; 4 : 1 : 2 y ácido acético 15 %) y por HPLC. El HPLC preparativo fue realizado sobre un Hitachi 6200, usando una columna inertsil ODS-2 (20 Φ x 250 mm) y AcOH o HCOOH como solventes. En este proceso de purificación se obtuvieron : pigmento 1 (25 mg) y, pigmento 2 (12 mg), a partir de 30 gramos de material seco de pétalos rosados, y pigmento 3 (46 mg) y pigmento 4 (16 mg), a partir de 50 gramos de material seco de pétalos púrpura.

El pigmento 1 y 2 fueron hidrolizados con HCl 2 M para dar cianidina, glucosa y xilosa; mientras que, 3 y 4 dio delphinidina y los mismos azúcares. Por hidrólisis alcalina, 1 y 3 se convirtió en 2 y 4 respectivamente, con producción de ácido malónico. Las características espectrales UV-Visible, de estos compuestos concuerdan con los de la cianidina (1 y 2) y la delphinidina (3 y 4) 3-glicosídicas (Tabla N° 2.10). También 2 y 4 fueron identificados con estándares de cianidina-3-sambubiósido y delphinidina-3-sambubiósido por TLC y HPLC, respectivamente (tabla 9), En la hidrólisis parcial de 2 (desacilado 1) y 4 (desacilado 3) convirtió en cada una de sus agliconas con una antocianina intermedia. Además, el espectro de masa FAB-MS de 1-4 dio [M+] a m/z : 667, 581, 683 y 597, respectivamente (Tabla N° 9). Estos datos muestran que la estructura de 1 a 4 son: cianidina-3-malonilsambubiósido (Cy 3m-GX), cianidina 3-sambubiósido (Cy 3-GX), delphinidina 3-malonilsambubiósido (Dp 3m-GX), delphinidina 3-sambubiósido (Cy 3m-GX), respectivamente.

Tabla N° 2.10.- Propiedades cromatográficas y espectrales de las antocianinas a partir de las flores rosadas y púrpura del *Ranunculus asiaticus*(107).

(a) Valores de R_f100 en la cromatografía de papel

Antocianinas	BAW	BuH	HCl 1%	HAc-HCl
Cy 3m-GX (1)	53	48	40	69
Cy 3-GX (2)	48	32	27	55
Dp 3m-GX (3)	51	41	40	67
Dp 3-GX (4)	42	25	27	53

(b) Valores de λ max para el UV-Visible

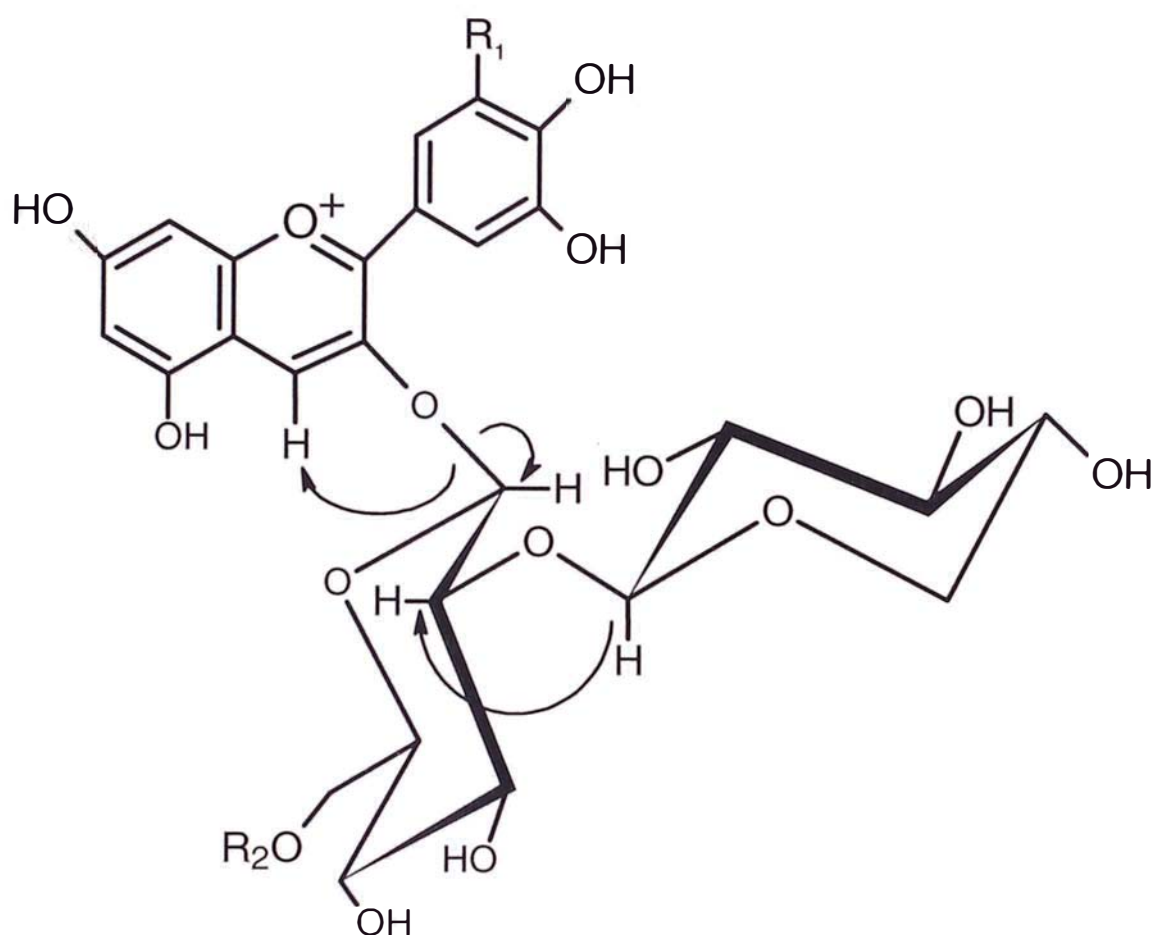
Antocianinas	λ max(nm)	E440/E _{max}	E310/E _{max}	+AlCl ₃	FAB-MS
Cy 3m-GX(1)	283, 529	22	15	+	667
Cy 3-GX(2)	282, 529	22	12	+	581
Dp 3m-GX(3)	279, 541	17	15	+	683
Dp 3-GX(4)	278, 541	18	18	+	597

Tabla N° 2.11.- Datos de RMN-¹H para las antocianinas de las flores de Ranunculos asiaticus (TFA-DMSO-d₆, 1 : 9) a 25°C(107).

H	1	2	3	4
Antocianidinas				
4	8,82 s	8,88 s	8,76 s	8,80 s
6	6,89 d (1,8)	6,91 d (1,5)	6,85 br	6,86 d (2,0)
8	7,01 d (1,8)	7,03 d (1,5)	6,99 br	6,99 d (2,0)
2 ó 2' y 6'	7,97 d(2,3)	8,01 d (2,3)	7,75 s	7,77 s
5'	7,07 d (8,7)	7,09 d (8,6)		
6'	8,32 dd(2,3y 8,7)	8,31 dd(2,3y 8,6)		
Glucosa*				
1	5,64 d (7,7)	6,60 d (7,7)	6,67 d (7,7)	5,64 d (7,7)
2	3,93 t (9,3)	3,86 t (8,3)	4,02 t (8,1)	3,97 t (8,1)
3	3,67 t (9,1)	3,63 t (8,8)	3,67 t (9,0)	3,64 t (9,0)
4	3,32 t (9,1)	3,32 t (8,6)	3,38 t (7,7)	3,36 t (9,4)
5	3,88 t (8,4)	3,52- 3,56 m	3,95 t (9,6)	3,54 dd (5,6y 9,4)
6a	4,13dd(7,6y10,8)	3,54-3,60 m	4,17dd(7,7y11,6)	3,59 m
6b	4,41 d(10,8)	3,67 d(10,3)	4,41 d (11,6)	3,69 d (11,1)
Xilosa*				
1	4,71 d(7,7)	4,68 d(7,7)	4,59 d (7,7)	4,56 d (7,7)
2	2,97 t(8,3)	2,95 t(8,2)	2,96 t (7,7)	2,95 t(8,6)
3	3,12 t(8,8)	3,12 t(8,8)	3,08 t (8,6)	3,07 t(8,6)
4	3,25 dd(5,4y8,8)	3,22-3,28 m	2,73 t (10,7)	2,72 t(11,1)
5a	2,90-2,96m	2,93 dd (10,5y17)	3,14 m	3,12 m
5b	3,53dd (5,4y12)	3,47-3,53 m	3,22dd (4,7y10,7)	3,20 dd(4,7y11,1)
Ácido malónico				
CH ₂	3,39d (16)		3,35-3,36	
	3,34d (16)			

* Asignado por COSY ¹H - ¹H.

La constantes de acoplamiento, J (Hz) se ubican entre paréntesis.



- 1 $R_1 = H, R_2 = COCH_2COOH$
- 2 $R_1 = R_2 = H$
- 3 $R_1 = OH, R_2 = COCH_2COOH$
- 4 $R_1 = OH, R_2 = H$

Figura N° 2.57.- Antocianinas 1 - 4 del *Ranunculus asiaticus* observados en el NOEs están indicados por las flechas(107).

Los detalles de la estructura de estos compuestos se dilucidaron por RMN-¹H incluyendo COSY ¹H-¹H y NOE diferencial como se muestra en la Tabla N°2.11. En la región aromática las señales características fueron fácilmente correlacionadas. Las señales del azúcar enlazadas fueron observadas entre $\delta = 5,67 - 2,72$. Dos protones anoméricos aparecían en estos del **1-4** y los acoplamiento de largo alcance ($J = 7,7 \text{ Hz}$) indicaban que estos azúcares estaban enlazadas por enlaces β -glicosídicos. También se observaron constantes de acoplamiento de $J = 4,7 - 17 \text{ Hz}$ este se deben a los acoplamiento vecinales de los protones del anillo con los hidrógenos del carbono anomérico de las unidades de β -piranosas. La posición de la unión fue confirmada por NOE diferencial (Figura N°2.57).

La aparición de señales NOE deferencial en H-4 de la cianindina (**1** ó **2**) o de delfinidina (**3** ó **4**) por irradiación de H-1 de la glucosa de **1-4** indican que la glucosa está unida por 3-OH de c/u de las agliconas a través de enlaces glicosídicos. También la presencia de NOE diferencial fue observado entre H-1 de xilosa de H-2 de la glucosa en cualquiera de los cuatro compuestos. Además en **1** y **3**, las señales de H-6a y 6b de la glucosa fueron desplazados hacia campo bajo en comparación con aquellos de **2** y **4**, respectivamente, indicamdo que el grupo malonil está unido por 6-OH de la glucosa en **1** y **3**, respectivamente. Por consiguiente, las estructuras de **1** a **4** son :

Cianidin-3-O-[2-O-(β -xilopiranosil)-6-O-malonil- β -D-glucopiranosido]

Cianidin-3-O-[2-O-(β -xilopiranosil)- β -D-glucopiranosido]

Delfinidin-3-O-[2-O-(β -xilopiranosil)-6-O-malonil- β -D-glucopiranosido]

Delfinidin-3-O-[2-O-(β -xilopiranosil)- β -D-glucopiranosido]

G.- IMPORTANCIA DE LAS ANTOCIANINAS-APLICACIONES

1.- Antocianinas de las uvas (piel o cáscara)

a) Aspectos generales

La cáscara o piel de la uva, subproducto de la industria vitivinícola, es la fuente usual de antocianinas, aún hoy en día, aunque debemos destacar que el maíz morado y la col morada están alcanzando mucho interés como fuentes potenciales de estos pigmentos.

En Europa se procesan unas 10 000 toneladas(23) de cáscaras de uvas anualmente produciéndose alrededor de 50 toneladas de antocianinas. Si consideramos todo el consumo mundial de uvas se estima que podría obtenerse potencialmente 10 000 toneladas de antocianinas. El mayor productor de antocianina es Italia.

Los antocianos o antocianinas representan una parte importante tanto cuantitativa como cualitativamente de los flavonoides de las bayas de las uvas tintas y, en consecuencia, de los vinos resultantes. En las variedades de *Vitis vinifera*, Las antocianidinas presentes son la *cianidina*, *peonidina*, *petunidina*, *delfinidina* y *la malvidina* en forma de monoglucósidos que se fijan en posición 3; pero otras especies del género *Vitis* se encuentran en forma de 3,5-diglucósidos. Estas antocianinas son solubles en agua y mezclas agua- alcohol, produciéndose soluciones de color rojo a magenta a un pH = 3, sensibles al calor, oxígeno y luz. Los flavanoles también están presentes en la cáscara de la uva en estado de monómeros y en formas más o menos polimerizadas que constituyen los taninos catéquicos. Los principales flavanoles monoméricos de la uva son la (+)-catequina y su isómero, la (-)-epicatequina. Este último se puede encontrar en forma de éster gálico. Sus formas oligoméricas y poliméricas, que pueden comprender un número muy elevado de unidades, se designan por el término “taninos” o “proantocianidinas”, a causa de su propiedad de liberar antocianidinas en medio ácido por ruptura de las uniones intermonoméricas. El extracto contiene además, ácidos orgánicos principalmente ácido tartárico, así como taninos, azúcares, aminoácidos y minerales.

Debemos mencionar que dependiendo de la especie de género de *Vitis*, se han identificado de 5 a 17 antocianinas(109).

b) Formas de presentación y aplicaciones** Extracto líquido de las cáscaras de uva (23)*

El extracto líquido conteniendo las antocianinas se obtiene de las cáscaras de uva utilizando agua acidificada, el extracto inicial se concentra hasta obtener un líquido viscoso con un pH = 3, La intensidad del color llega hasta 330 unidades.

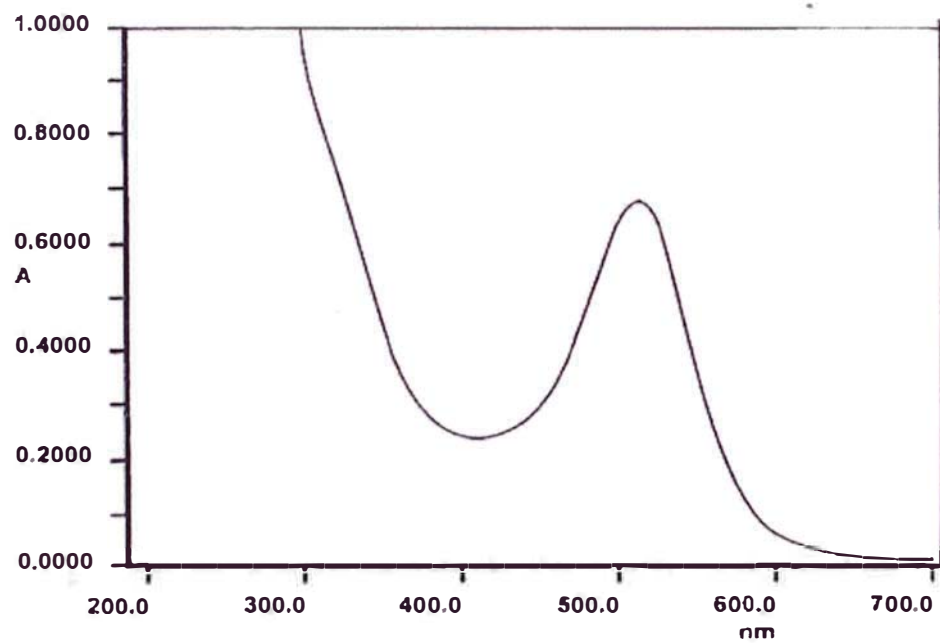
** Extracto seco de las cáscaras de uvas (23)*

El extracto viscoso anterior se atomiza utilizando como vehículo la maltodextrina, obteniéndose un polvo higroscópico de color rojo con una intensidad del color de hasta 1275 unidades, y un contenido de antocianinas del 4 %.

Ambos extractos se utilizan en bebidas alcohólicas y no alcohólicas, dulces, caramelos gelatinas, helados, yogurt y en productos farmacéuticos y cosméticos.



(a)



(b)

Figura N^o 2.58.- (a) Uvas y su extracto(23).

(b)Espectro UV - visible del extracto de cáscaras de uva. El coeficiente de extinción del extracto de uva es $E^{1\%} = 500$ a $pH = 1,5$ a λ_{max} cercano a 520 nm.(23)

c) **Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza (110)**

El papel de los compuestos fenólicos en las variedades de uva tinta es determinante para la calidad del vino cuyo destino es la crianza en barrica. El contenido en compuestos fenólicos del vino depende tanto de la variedad vinífera y el rendimiento de la cosecha como de las condiciones edafoclimáticas y técnicas culturales aplicadas al viñedo.

Entre los compuestos fenólicos presentes, son especialmente relevantes en la calidad de los vinos tintos de crianza los flavonoides, básicamente los flavanoles y las antocianidinas. Hay 2 grupos mayoritarios de taninos en la uva: las procianidinas, derivadas de catequina y epicatequina; y los prodelphinidoles, derivados de galocatequina y epigalocatequina. La capacidad para el envejecimiento en barrica de los vinos tintos está relacionada en gran medida con su composición en compuestos fenólicos (básicamente de antocianinas responsables del color rojo, y de procianidinas responsables de parte del color amarillo y del gusto amargo, así como de la astringencia y del cuerpo del vino). El color del vino tinto se debe a la presencia de las antocianinas, en forma libre y combinadas a las procianidinas, que contribuyen a las componentes roja, amarilla y azul del color del vino, en función del pH del medio y también a las procianidinas y flavanoles que contribuyen a la componente amarilla del color del vino.

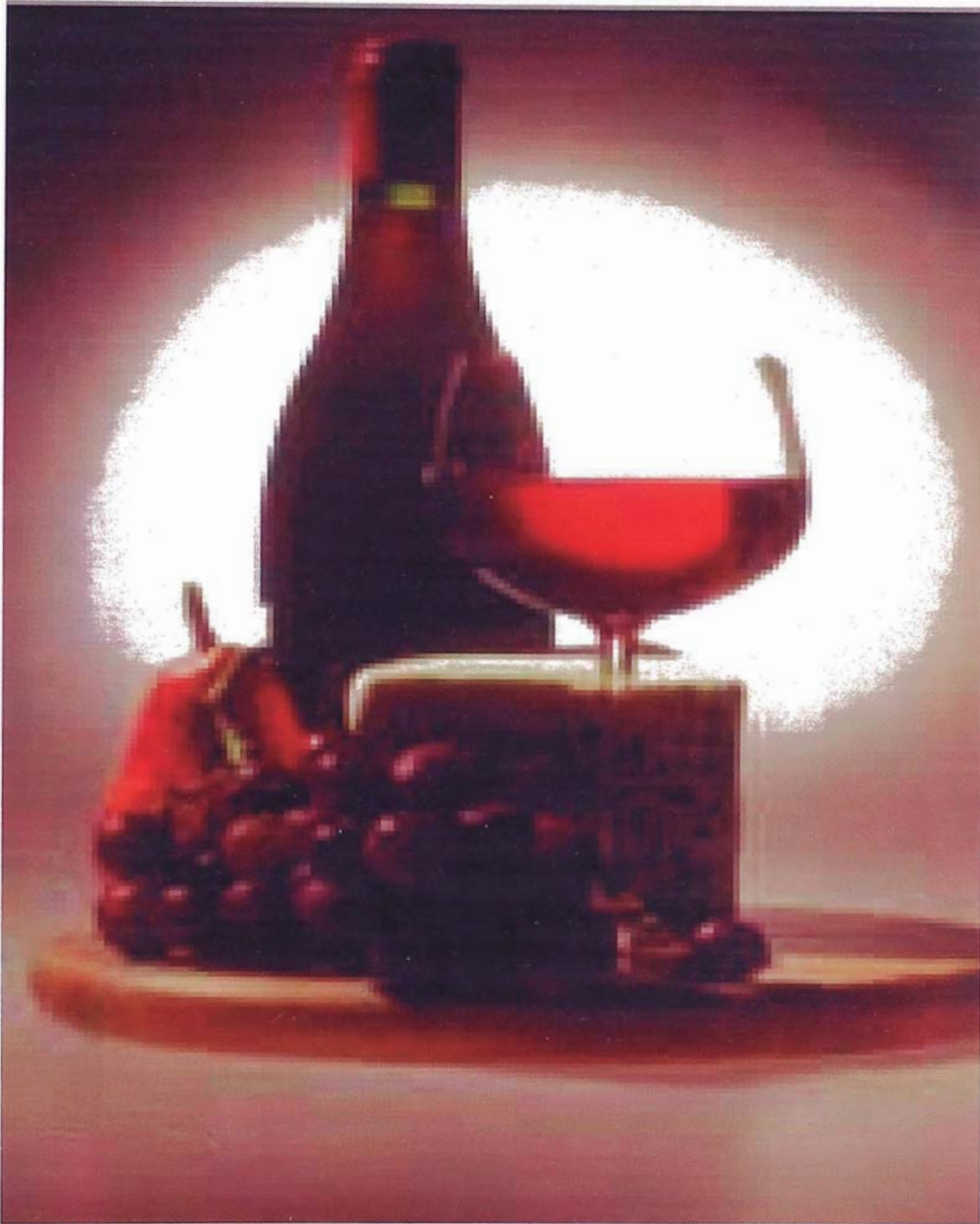


Figura N° 2.59.- Uvas y vino tinto de crianza(127)

Durante el proceso de envejecimiento se produce una polimerización de las procianidinas que da lugar a una disminución del gusto amargo y de la astringencia, y también a un incremento de la componente amarilla del color. Simultáneamente las antocianinas pueden dar lugar a dos tipos de reacciones: por una parte son oxidadas, lo que implica una disminución de la componente roja del color, y por otra se produce una combinación entre antocianinas y procianidinas, lo que da lugar a una estabilización del color rojo. Son precisamente estas combinaciones de antocianinas-procianidinas las responsables del color de los vinos tintos añejos, así como de la capacidad del vino para resistir la capacidad oxidativa en la barrica. Por lo tanto, un vino tinto destinado a la crianza en barrica debe poseer una concentración elevada de antocianinas, ya que si no la oxidación de las mismas provocará una pérdida importante del color rojo del vino durante el envejecimiento. De igual manera, tiene que poseer una elevada concentración de procianidinas, favoreciendo la combinación entre las antocianinas y las procianidinas permitiendo una estabilización del color frente a posteriores oxidaciones. En el caso de los antocianos, las diversas posibilidades de esterificación del azúcar glicosidante tienen un efecto particularmente determinante sobre la estabilidad de la molécula y sus capacidades colorantes.

d) Propiedades antioxidantes del vino y sus componentes (111)

i Introducción

Se ha estimado que aproximadamente un 2 % del oxígeno consumido por un organismo normal va a la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs) de las cuales varias son radicales libres (112). Cuando la generación de EROs sobrepasa las numerosas barreras de defensa antioxidantes del organismo, se produce daño por lesión química de las estructuras biológicas y a este proceso le denominamos estrés oxidativo. En cantidad, las principales especies reactivas del oxígeno que se generan durante la respiración son el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas a su vez dan origen al radical hidroxilo $\cdot OH$. El anión superóxido y el radical hidroxilo son radicales libres, es decir especies alta-

mente reactivas que poseen electrones desapareados. Esto los hace sumamente reactivos pudiendo provocar reacciones en cadena. El daño oxidativo que estas especies pueden producir en las macromoléculas biológicas es de consecuencias críticas. Reaccionan con lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN en el interior de las células y con componentes de la matriz extracelular, por lo que pueden desencadenar un daño irreversible que si es muy extenso, puede llevar a la muerte celular. Entre las numerosas patologías asociadas a estrés oxidativo están las dos principales causas de muerte en países desarrollados: la arteriosclerosis y el cáncer; también se ven favorecidas otras condiciones patológicas como cataratas, artritis reumatoídea, diabetes y enfermedad de Alzheimer. El proceso biológico del envejecimiento se acelera en función de la magnitud del estrés oxidativo al que están sometidos organismos de muy diferentes especies (113).

Las defensas antioxidantes de los organismos aeróbicos son de tipo enzimático y no enzimático. La primera defensa antioxidante es intracelular y la constituyen las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. Los antioxidantes no enzimáticos extracelulares presentes en el suero son moléculas de bajo peso molecular como vitamina C, vitamina E y urato, además de otras sustancias presentes en menor concentración como β -caroteno, bilirrubina y glutatión. Estas sustancias son capaces de atrapar especies reactivas de oxígeno consumiéndose en este proceso. Los principales antioxidantes extracelulares son nutrientes naturales que se ingieren en la dieta.

Los polifenoles son un grupo de compuestos presentes en la naturaleza que poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos. Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes necesarios para el funcionamiento de las células vegetales, que se encuentran en frutas y verduras, principalmente, uvas, manzanas y cebollas, y en bebidas como chicha morada y vino.

La estructura química de los polifenoles es especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante (donador de hidrógeno o electrones, o atrapador de radicales libres). En estudios in vitro, muchos polifenoles naturales son mejores antioxidantes que las vitamina E y

C. Además, su capacidad de quelar metales, especialmente cobre y hierro, los hace actuar indirectamente como antioxidantes ya que inhiben la acción de los metales como catalizadores en la formación de radicales libres. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo (114).

La observación de que el consumo de grasas saturadas en Francia es mayor que en países desarrollados como USA y el Reino Unido y que, sin embargo, la muerte por enfermedad cardiovascular es aproximadamente un tercio de la de estos otros países, a iguales niveles de colesterol plasmático, llevó a estudiar las causas de esta situación paradójica, a la que se denominó Paradoja Francesa. Las investigaciones le atribuyen un papel clave al consumo moderado de vino en la dieta de los franceses, por su alto contenido en compuestos polifenólicos naturales antioxidantes (115). Estos polifenoles protegerían a las LDL (lipoproteínas de baja densidad) de la oxidación, y por lo tanto de la iniciación del proceso de arteriosclerosis. Los flavonoides ejercen numerosos efectos bioquímicos, aparentemente beneficiosos, además de su acción como antioxidantes. In vitro poseen actividades anti-inflamatoria, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana y antineoplásica (116, 117). Sin embargo, la extrapolación de resultados in vitro a lo que ocurre en un organismo in vivo, sólo es posible cuando se conoce la biodisponibilidad del compuesto activo, vale decir cuando se sabe que es estable en el tubo digestivo, que se absorbe, y que alcanza niveles circulantes significativos. Los estudios de biodisponibilidad de polifenoles son muy escasos y no permiten aún conclusiones definitivas.

ii Capacidad antioxidante del vino

Al postularse la acción protectora del vino, en algunas enfermedades crónicas, como resultado de su capacidad antioxidante, diferentes grupos han abordado la medición de esta capacidad. Las propiedades antioxidantes del vino se han atribuido a sus componentes polifenólicos; el vino libre de polifenoles no posee dicha actividad. Se han estudiado distintas

fracciones del vino con el fin de identificar los compuestos responsables de esta capacidad. Complementariamente, se ha evaluado la capacidad antioxidante de los distintos compuestos puros con el fin de conocer la contribución relativa de cada uno.

Campos (118, 119) determinaron TRAP (Potencial Antioxidante Total) para varios vinos chilenos, utilizando el procedimiento del blanqueamiento de los radicales catiónicos ABTS (ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)). Los resultados muestran que los valores de TRAP para los vinos tintos son similares, con un promedio de $29,1 \pm 2,3$ mM. Los vinos blancos tienen valores de TRAP mucho menores, con un promedio de $4,2 \pm 1,2$ mM. Concluyen además que las especies antioxidantes activas son fenoles protonados y que aproximadamente un 80% de ellos son hidrofílicos.

Estos mismos autores determinaron TAR (o Reactividad Antioxidante Total) para algunos vinos chilenos utilizando el sistema luminol/ABAP. Los TAR para vinos tinto fueron 33 y 37 mM ($n = 2$) y para blanco 5,5 mM ($n = 1$) (Campos, 1996). Al intentar medir TRAP con luminol/ABAP, la recuperación era muy lenta, lo que indica que en estos vinos tintos existen gran cantidad de antioxidantes de baja eficiencia. En general, se observó una buena correlación entre TAR y TRAP, con valores aproximadamente seis veces mayor en vinos tintos que en blancos. Se estableció así que los vinos tintos chilenos poseen alta capacidad antioxidante la que se debe tanto a antioxidantes muy reactivos, como lo indican los valores de TAR, como a antioxidantes menos reactivos, dada la lenta recuperación en las determinaciones de TRAP.

Whitehead et al. (120), determinaron la capacidad antioxidante total de nueve variedades distintas de vino tinto y cuatro de vino blanco utilizando el procedimiento de quenching de la luminiscencia con el sistema luminol/peroxidasa. Los TRAP para vinos tintos alcanzaron un promedio de $15,4 \pm 3,4$ mM y para los blancos $1,1 \pm 0,2$ mM. Los jugos de manzana, naranja y uva mostraron valores TRAP de 7,89, 2,00 y 0,68 mM, respectivamente.

Rice-Evans et al. (114) determinaron la actividad antioxidante total de vinos (TAA), utilizando el ensayo ferrilmioglobina/ABTS. Las actividades en vinos tinto variaron entre 12-14 mM para Pinot Noir Californiano, Rioja y Rouge, 16 mM para Shiraz Australiano y

23 mM para Bordeaux y Chianti., con un promedio de 16,7 mM. Las actividades antioxidantes de los vinos correlacionan con el contenido total en fenoles.

Estos autores basándose en la composición de polifenoles en el vino (121, 122) y datos de actividades antioxidantes (equivalentes en Trolox) de polifenoles, calcularon la contribución de cada componente del vino a la capacidad antioxidante de este. Haciendo este cálculo se encuentra que sólo se puede justificar un 25% de la capacidad antioxidante del vino. Es necesario tomar en cuenta que los polifenoles identificados por Frankel et al. (1995), solo representan un 18% del total de polifenoles del vino, indicando que compuestos no identificados, como otros polifenoles y ácidos fenólicos, y posiblemente polímeros, contribuyen en forma importante al TAA del vino tinto.

Ursini et al. (123) estudiaron la capacidad antioxidante de distintos vinos y sus fracciones separadas por extracción en fase sólida y análisis por HPLC. Según sus resultados la capacidad antioxidante de un vino tinto de cinco años (Schioppettino) esta dada por: **antocianinas 55%**, taninos 25%, flavonoles 15% y ácidos fenólicos hidrosolubles 5%. Según estos autores, el análisis UV-VIS del llamado ensayo de la «intensidad colorante» (Abs 520 + Abs 420), realizado en el mismo vino producido en distintos años, correlaciona con la capacidad antioxidante ($R=0,99$). Esto apoya el papel principal postulado para los monómeros de antocianinas y polímeros de antocianinas en la capacidad antioxidante total.

2.- Maíz morado y antocianinas: (Ver Anexo N° 12)

a) Aspectos generales

El maíz es de origen americano, su antigüedad está comprobada por las mazorcas encontradas en las tumbas antiquísimas así como las representaciones del maíz en la cerámica precolombina. Se considera que Colón lo llevó a España en su primer viaje, ya que, en 1498 se cultivó en Castilla y en Andalucía en 1826. En el Perú existen diversas variedades, entre las mencionadas por Soukup, tenemos el culli que tiene granos rojo-oscuro casi morados que se emplea en la preparación de la chicha morada o como colorante de vianda y la

variedad Haña-Kaa(v. aimara), llamada maíz morado.

De acuerdo a las zonas de cultivo se conoce como «maíz centeno», morado de Caraz, «negro de Junín», «Cuzco morado», entre otros; también se cultiva en Arequipa, Ayacucho, Cajamarca y Huancavelica.

b) La materia colorante

Se ha identificado principalmente las siguientes antocianinas, 3-glucósidos de la cianidina, pelargonidina y peonidina, 3-galactósido de cianidina, libres y acilados.

El uso principal desde la antigüedad es en la preparación de la chicha morada y mazamorra morada; actualmente se preparan extractos acuosos atomizados. El extracto de maíz morado puede ser usado en productos ácidos donde se desee un color rojo. Al colorante de maíz morado se le clasifica con el número E-163 . El extracto de maíz morado se presenta en dos formas:

** Extracto líquido del maíz morado*

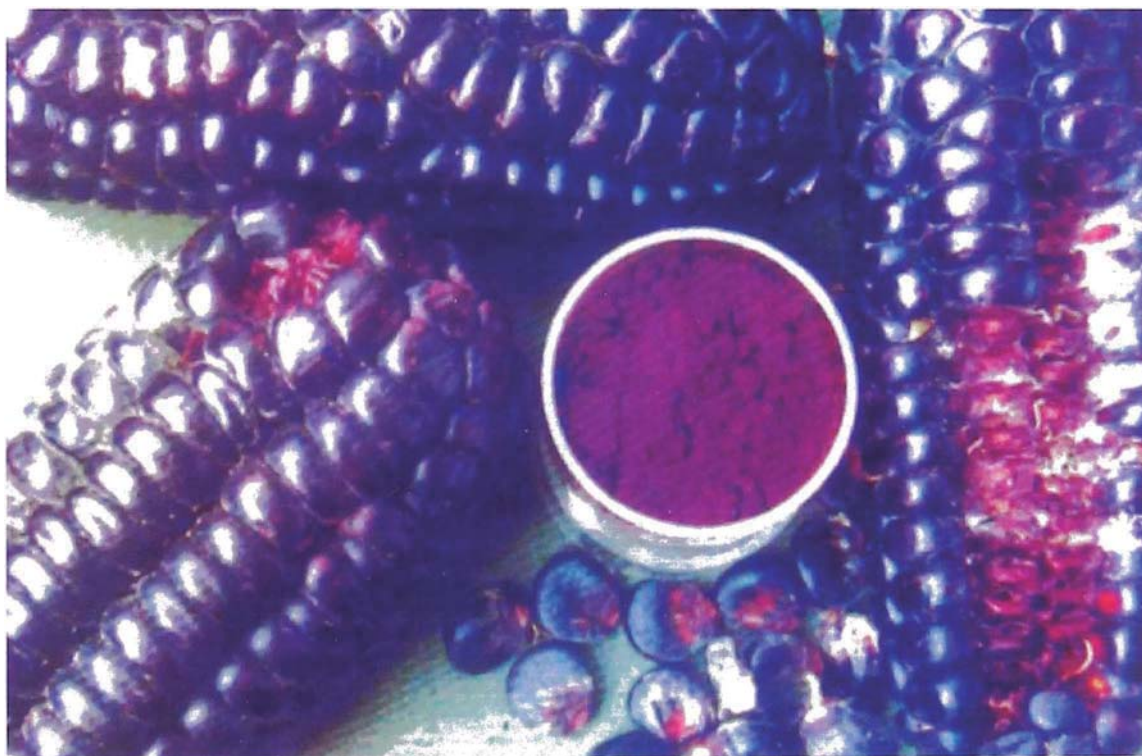
Extracto líquido viscoso con un pH de 3, cuyo nombre comercial: P.C. Anthocyanin Extract A, pureza 1-3% antocianina. Se le puede emplear en la coloración de jaleas, bebidas alcohólicas y carbonatadas, caramelos, mermeladas, yogurt, gelatina, etc.

** Extracto seco del maíz morado*

El extracto viscoso anterior se atomiza utilizando como vehículo la maltodextrina, obteniéndose un polvo higroscópico de color rojo con un contenido de antocianinas del 4%.



(a)



(b)

Figura N° 2.60.- (a) Chicha morada.
(b) Maíz morado y su extracto(23)

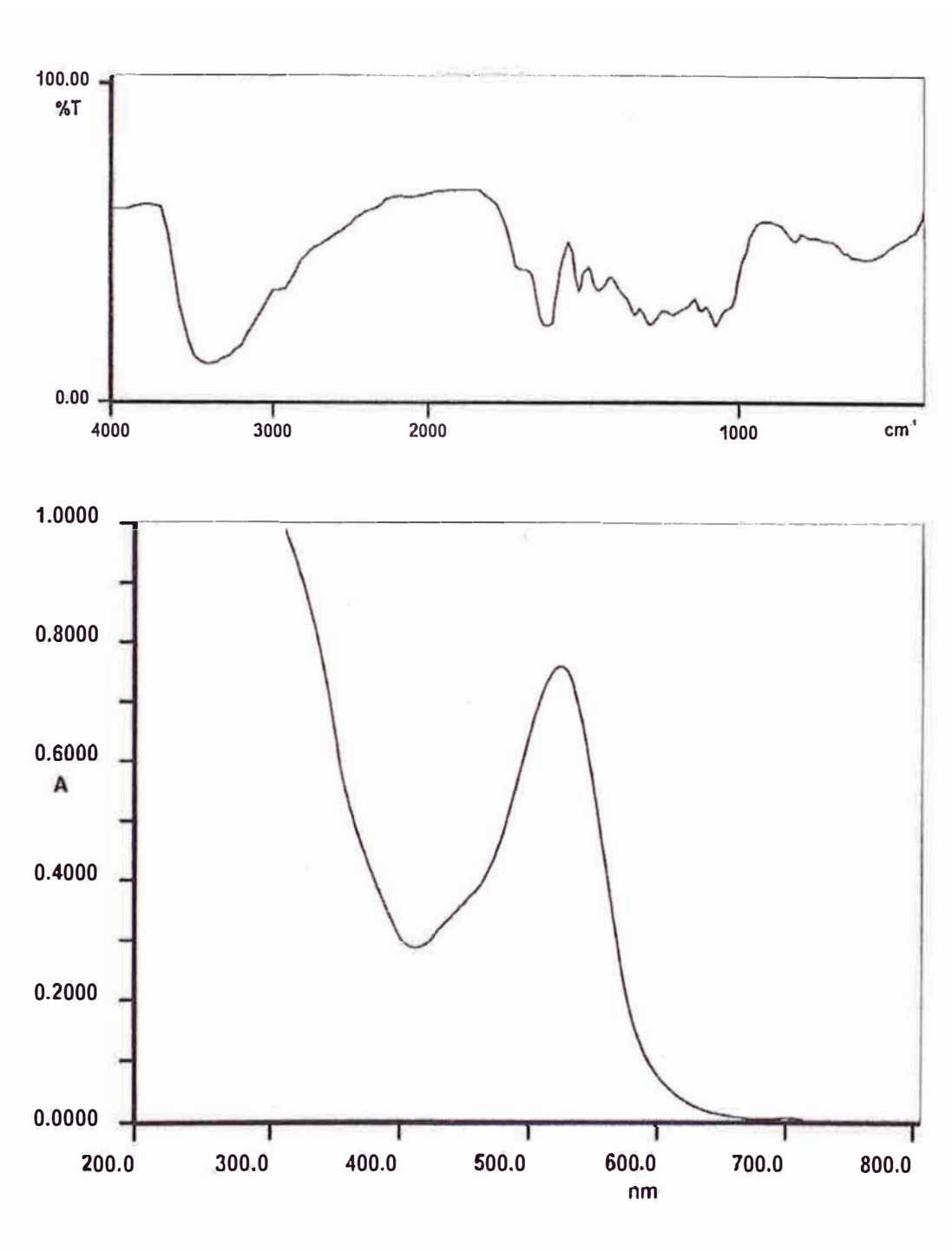


Figura N^o 2.61.- Espectro Infrarrojo y UV-Visible de las antocianinas del maíz morado(23)

CAPÍTULO III

CONCLUSIONES

- 1.- Las antocianinas basadas en la cianidina ocurren con mayor frecuencia. El porcentaje de ocurrencia es aproximadamente: 50 % de cianidina, 12 % de pelargonidina, 12 % peonidina, 12 % de delphinidina y 7 % de petunidina y 7 % de malvidina.
- 2.- Respecto a las antocianinas, los 3-glicósidos tienen una ocurrencia 2,5 veces mayor que los 3,5- diglicósidos, siendo el más común la cianidin-3-glucósido.
- 3.- La hidrólisis lenta de los 3-glicósidos de una antocianina bajo condiciones ácidas es presumiblemente responsable de que las antocianinas se degraden a largo plazo.
- 4.- De acuerdo a las investigaciones realizadas se concluye que los sustituyentes hidroxilos en posición 7 y 4' mejoran la estabilidad de las antocianinas; mientras que, la metilación de éstos y/o la introducción de grupos OH en el anillo B, disminuye la estabilidad de las mismas.
- 5.- Un método sugerido para incrementar la estabilidad de las antocianinas implica la sustitución de la posición 4 con grupo metilo o fenilo. Si bien estos compuestos muestran mejor resistencia al decoloramiento en presencia de SO₂ o de ácido ascórbico, su comportamiento en soluciones acuosas es similar a las de los compuestos originales no sustituido.
- 6.- El proceso de estabilización por copigmentación está relacionado con las

interacciones hidrofóbicas entre el anillo pirilio y los sustituyentes aromáticos de los grupos acilos, formación de enlaces puente de hidrógeno, la estructura del complejo formado, las interacciones electrostáticas y los efectos estéricos.

7.- El efecto de copigmentación ha sido confirmado por recombinación de antocianinas y C-glicosilflavonas previamente separadas (124).

8.- Los resultados de las investigaciones sobre la copigmentación confirman la alta resistencia de los 3-monoglicósidos al ataque nucleofílico cuando es comparado con los 3,5-diglicósidos. Este efecto es atribuido a la deslocalización de la densidad electrónica del oxígeno anomérico **exo** respecto al anillo piranosico, resultando en una reducción de la capacidad de donación de electrones hacia el anillo pirilio. Cuando se reemplaza el segundo grupo OH por un grupo β -D-glucopiranosiloxi, este sustituyente se espera que aumente el carácter electrofílico, del C-2 y/o C-4, resultando en la formación de gran cantidad del hemiacetal en equilibrio.

9.- A temperatura ambiente y en condiciones moderadamente ácidas (pH ~ 4,6), las antocianinas existen comúnmente en la forma de un equilibrio tautomérico entre el carbinol y la chalcona. La posición de este equilibrio bajo estas condiciones generalmente favorece la pseudo-base carbinol. A 25°C la cantidad de la chalcona es 2 veces mayor en las antocianinas 3-glicosidadas que en las 3,5-diglicosidadas. En medio más ácido (pH < 4), debido al equilibrio de hidratación, el catión flavilio y la pseudo-base carbinol predominan.

10.- Se ha demostrado que el gran efecto térmico en las antocianinas es solo aparente y que es la estructura del agua en la fase líquida, la que gobierna la asociación molecular entre los cationes flavilio de la antocianina y el copigmento. En ausencia de agua, el efecto de copigmentación probablemente no existe.

11.- Otro punto interesante que se ha encontrado es que la reacción de copigmentación

posee características frecuentemente encontradas en reacciones biológicas, esto es, ocurre en el agua, es sensible al pH, temperatura y composición del medio acuoso.

12.- El conocimiento de los copigmentos hasta hoy en día están limitadas a sustancias que se encuentran dentro de las células de los vacuolos que contienen las antocianinas. En opinión de varios autores, muchas sustancias químicas y bioquímicas naturales y sintéticas, son capaces de actuar como copigmentos por lo que las investigaciones debieran estar orientadas hacia este campo de tal forma que se puedan estabilizar mejor las antocianinas, por ejemplo, del maíz morado y así, se pueda incrementar nuestros niveles de exportación en este rubro.

13.- En la opinión de diversos autores, los descubrimientos de los últimos 10 años son valiosos para la industria de alimentos y bebidas los cuales requieren del color rojo natural para reemplazar colorantes azoicos prohibidos o cuestionablemente tóxicos para dar color a muchos productos alimenticios. Las antocianinas comunes las cuales están desprotegidos contra la hidratación, no pueden ser usados como colorantes de alimentos. La copigmentación puede proveer tal protección del color y, además, la copigmentación es un modelo único que puede ayudar en la síntesis de nuevas antocianinas con grupos protectores covalentemente enlazados a la antocianidina.

14.- Otra aplicación importante de este trabajo es en el proceso de envejecimiento de los vinos tintos. Los taninos y las antocianinas ambos están involucrados en este proceso económicamente importante. Los taninos son buenos copigmentos, y desde que la copigmentación tiene lugar en agua con etanol al 10 %, la reacción de copigmentación se cree que es la etapa más importante en el desarrollo y estabilidad de los vinos tintos, un hecho que no ha sido investigado hasta ahora.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Halagan, J., B. *Cereal Foods World*, **36** (11), pág. 956-948.
- 2.- Frick, D., Huck, O. *Cereal Foods World*, **40** (4), pág. 209-218.
- 3.- *Code of Federal Regulations*, **21**, parte 74
- 4.- <http://www.fortunecity.com/littleitaly/siena/600/Aditivos.htm#COLORANTES>
- 5.- ABC de los aditivos. Ministerios de Sanidad y Consumo Instituto Nacional del Consumo, 1ª Edición, Madrid, 1989.
- 6.- Calvo Rebollar, M., Aditivos Alimentarios. Propiedades, Aplicaciones y Efectos sobre la salud, Librería General, Zaragoza, 1991.
- 7.- Compendio de Datos Toxicológicos y de Identidad y Pureza de los Aditivos Alimentarios Ministerios de Sanidad y Consumo. Secretaría General Técnica, Madrid, 1994.
- 8.- San F. et al., Ensayos toxicológicos para el estudio y Contratación de un Aditivo Alimentario, Simposium Internacional sobre los Aditivos en la Industria Agroalimentaria, Publicaciones Científicas M.A.P.A., Madrid, 1986.
- 9.- Villanira, I., Aditivos Alimentarios. Fundación Española de Nutrición, Serie Divulgación N°4, Madrid, 1985.
- 10.- Hughes, C., Guía de los aditivos, Editorial Acribia S.A., Zaragoza.
- 11.- Francis, F., J. *Food Technol.*, **41**, 62-68 (1987). Lesser-Known food colorante.
- 12.- Schwartz, S., J. and Lorenzo, T., V., *Crit. Rev. Food Sci. Technol.*, **29**, 1-17 (1990) Chlorophyls in foods.
- 13.- Gordon, H., T. and Bouernfeind, J, C., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **18**, 59 (1982). Carotenoids as food colorants.

- 14.- Peto, R., et al., *Nature*, **290**, 201-208 (1981). Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates?.
- 15.- Simpson, K., Carotenoids pigments in seafood, en *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products*, 115-136 (1982).
- 16.- Hrazdina, G., Anthocyanins, in: *The Flavonoids* (Harborne, J., B. y Malay, T., J., Eds), Chapman & Hall. (1982), pág. 135-188.
- 17.- Francis, F., J., *Crit. Rev. Food Sci. Nut.*, **28**, 273-314 (1989). Food colorants: Anthocyanins.
- 18.- Noonan, J., E. and Meggos, H., Synthetic food colours, in: *CRC Handbook of Food Additives*, 2a Ed. Vol II (Furia, T.E., Ed.), CRC Press (1980), pág. 339-383.
- 19.- Comber, R., D. and Haveland-Smith, R. B., *Mutation Res.* **98**, 101-248 (1982). A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes.
- 20.- Timberlake, C., F. and Bridle, P. " The Flavonoids " (J.B. Harbone, T.M. Mabry and H. Mabry, eds.). Chapman an Hall, London (1975).
- 21.- Robinson, G., M. and Robinson, R., *Biochem. J.*, **26**, 1647 (1932).
- 22.- Karrer, P and Widmer, R., *Helv. Chim. Acta*, **10**, 5 (1927).
- 23.- Lock de Ugaz, Olga, *Colorantes Naturales*, PUCP- Fondo Educativo Editorial (1997), Lima.
- 24.- Hrazdina, G., Anthocyanins in: *the Flavonoids*, (Harbone, J.B., Marby, T.J., Eds.) Chapman and Hall, N.Y., (1982), pág 135-186.
- 25.- Jackman, R., L., Smith, J., L., Anthocyanins and betalains in: *Natural Food Colorantes* (Hendry, G., A., Houghton, J., D., eds.) Blackie, Glasgow, (1992), pág.182-215.
- 26.- Timberlake, C., F. and Bridle, P., Distribution of Anthocyanins in Food Plants in: *Anthocyanins as Food Color* (Markarkis, P, ed), Academic Press, N. Y., (1982), pág. 125-162.
- 27.- Klages, F., *Tratado de Química Orgánica*, tomo III, Campos especiales, Editorial Reverté, México, (1968), pág. 194 - 200.
- 28.- Jurd, L. "The Chemistry of Flavonoid Compounds" (T.A.Geissman, ed.). Pergamon Press. N. Y. and Oxford, (1962), pág. 107-155.

- 29.- Mabry, T., J., et al. "The Systematic Identification of flavonoids", Springer Verlag, Berlin, (1970).
- 30.- Swain, T. and Hillis, W., E., J. Sci. Fd. Agric., **10**, 54 (1959).
- 31.- Smith, H. « Phytochrome » (Mitrakos, K. and Shropshire, W., Eds.). Academic Press. New York and London, (1972), pág 433-481.
- 32.- Birch, A., J. and Donovan, F., W., Aust. J. Chem., **6**, 360-368 (1953).
- 33.- Bird, A., E. and Marshall, A., C., J. Chem. Soc., **C** 2418 - 2420 (1969).
- 34.- Hanson, K., R. and Havir, E., A., Recent Adv. Phytochem. **4**, 45-48 (1972).
- 35.- Hanson, F., R. and Havir, E., A., in: « The enzymes (P. D. Boyer, ed.), Academic Press, New York and London, 3rd edn, vol 7, pág. 75-166 (1972).
- 36.- Subba, P., V. et al. Can., J. Biochem., **45**, 1863-1872 (1967).
- 37.- Attridge, H. and Zenk, M., H., Z. PflPhysiol., **64**, 145-168 (1971).
- 38.- Nair, P., M. and Vining, L., C., Phytochemistry, **4**, 161-168 (1965).
- 39.- Russell, D., W., J. Biol. Chem., **246**, 3870-3878 (1971).
- 40.- Russel, D., W. and Conn, E., E., Archs. Biochem. Biophys., **122**, 256-258 (1967).
- 41.- Russel, D. et al., Biochim. biophys. Acta, **170**, 210-213 (1968).
- 42.- Grisebach, H. and Grambow, H., J., Phytochemistry, **7**, 51-56 (1968).
- 43.- Pastchke, L., et al., Z. Naturf., **21b**, 45-47 (1966).
- 44.- Bulow, C. and Wagner, H., Ber. Dtsch. Chem. Ges. **34**, 1782 (1901).
- 45.- Bulow, C. and Wagner, H., Ibid. **36**, 1941 (1903).
- 46.- Malkin T. and Robinson, R., J. Chem. Soc., **127**, 1190 (1925).
- 47.- Jonhson W. and Melhuish, R., J. Chem. Soc. 346 (1947).
- 48.- Sweeny, J., G. and Iacobucci, G., A. . Tetrahedron **37**, 1481 (1958).
- 49.- Willstätter, R. and Zechmeister, L., Physik-Match. Kl. **34**, 886 (1914).
- 50.- Willstätter, R., et al., Ber. Dtchs. Chem. Ges. **47**, 1938 (1924).

- 51.- Perkin, W., H. and Robinson, R., *Pro. Chem. Soc.*, **19**, 149 (1907).
- 52.- Decker, H. et al., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **40**, 3815 (1907).
- 53.- Robinson, A. and Robinson, R., *J. Chem. Soc.*, 242 (1927).
- 54.- Robertson, A. and Robinson, R., *J. Chem. Soc.*, 1710 (1927).
- 55.- Robertson, A. and Robinson, R., *J. Chem. Soc.*, 2196 (1927).
- 56.- Robertson, A. and Robinson, R., *J. Chem. Soc.*, 1460 (1928).
- 57.- Levi, L., et al., *J. Chem. Soc.*, 2701 (1931).
- 58.- Jurd, L., *Chem. and Ind. London*, 1683 (1966).
- 59.- Wais, A.C., and Jurd, L., *Chem. and Ind. London*, 743 (1963)
- 60.- Robinson, R. and Walker, J., *J. Chem. Soc.*, 1435 (1934).
- 61.- Clark-Lewis, J., W. and Jemison, R., W., *Aust. J. Chem.*, **21**, 2247 (1968).
- 62.- Sweeny, J., G. and Iacobucci, G., A., *Tetrahedron*, **33**, 2923 (1977).
- 63.- Bulow, C. and Wagner, H., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **34**, 1782 (1901).
- 64.- Bulow, C and Wagner, H., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **36**, 1942 (1903).
- 65.- Goswami, M. and Chakravarty, A., *J. Indian. Chem. Soc.*, **9**, 599 (1932).
- 66.- Goswami, M. and Chakravarty, A., *J. Indian. Chem. Soc.*, **11**, 713 (1934).
- 67.- Mercier, M., et al., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 702 (1958).
- 68.- Brown, B., R. et al., *Chem. Ind. London*, 1237 (1962).
- 69.- Jurd, L., *J. Org. Chem.*, **28**, 987 (1963).
- 70.- Jurd, L. and Geissmann, A., *J. Org. Chem.*, **28**, 987 (1963).
- 71.- Timberlake, C., F. and Bridle, P., *J. Sci. Food Agric.*, **18**, 473 (1968).
- 72.- Harper, K., A., *Aust. J. Chem.*, **20**, 269 (1967).
- 73.- Harper, K., A. and Chandler, B., V., *Aust. J. Chem.*, **20**, 731-745 (1967).

- 74.- Brouillard, R. and Dubois, J-E., J. Am. Chem. Soc., **99**, 1359 (1977).
- 75.- Bauer, L. et al., Chem. Ind. London, 433 (1954).
- 76.- McClelland, R.A., Gedge, S., J. Am. Chem. Soc., **102**, 5838 (1980).
- 77.- Sondheimer, E. and Kertesz, Z., I., Food Res., **17**, 288 (1952).
- 78.- Sondheimer, E. and Kertesz, Z., I., Food Res., **18**, 575 (1953).
- 79.- Dilthey, W. and Quint, F., J. Prakt. Chem., **131**, 1 (1931).
- 80.- Jurd, L., Chem. Ind. London, 165 (1963).
- 81.- Jurd, L., Tetrahedron Letters, 1151 (1963).
- 82.- Jurd, L., Food Technol., 157 (1964).
- 83.- Brouillard, R., et al., J. Am. Chem. Soc., **111**, 2604-2610 (1989).
- 84.- Scheffldt, P. and Hrazdina, G., J. Food Sci., **43**, 517-520 (1978).
- 85.- Williams, M. and Hrazdina, G., J. Food Sci. **44**, 66-68 (1979).
- 86.- Goto, T. and Kondo, T., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., **30**, 17-33 (1991).
- 87.- Asem, S., et al., Phytochemistry, **11**, 1139 (1972).
- 88.- Hoshino, T. and Matsumoto, U., Tetraedron Letters, **21**, 1751 (1980).
- 89.- Hoshino, T., et al., Tetraedron Letters, **23**, 433 (1982).
- 90.- Mazza, G., and Brouillard, R., Food Chem., **25**, 207-225 (1987).
- 91.- Preston, N., W. and Timberlake, C., F., J. Chromat. **214**, 222 (1981).
- 92.- Niebes, P. and Janot, J., Bull. Roy. Soc. Liege, **39**, 525 (1970).
- 93.- Andrieux, J., et al., Bull Soc. Chim. Fr., 1967 (1976).
- 94.- Fuleki, T. and Francis, F., J., J. Food Sci., **33**, 72-77 (1968).
- 95.- Lindstedt, G., Acta chem. Scand., **4**, 448 (1950).
- 96.- Oshima Y., and Nakabayashi, T., J. Agr. Chem. Soc. Japan, **26**, 754 (1952).
- 97.- Nordström, C., G. and Swain, T., J. Chem. Soc., 2764 (1953).

- 98.- Bate-Smith, E., C. and Westall, R., G., *Biochim. Biophys. Acta*, **4**, 157 (1950).
- 99.- Hrazdina, G., Anthocyanins, in: « the flavonoids », (Harbone, J., Mabry, T., Eds.), Chapman and Hall, N.Y. (1982) pág. 135-186.
- 100.- Francis, F., J., Analysis of Anthocyanins, in: Anthocyanins as Food Color (P. Markarkis ed.), Academic Press, N.Y. (1982) pág. 181-207.
- 101.- Fuleki, T. and Francis, F., J., *J. Food Science*, **33**, 72-76 (1968).
- 102.- Deibner, L. and Bourzeix, M., *Ann. Technol. Agric.*, **12**, 287-312 (1963).
- 103.- Thompson J., F., *Botan. Rev.*, **25**, 208-228 (1959).
- 104.- Chandler, B., V. and Swain, T., *Nature*, **183**, 989 (1959).
- 105.- Fuleki, T. and Francis, F., J., *J. Food Sciences*, **33**, 78-82 (1968).
- 106.- Fuleki, T. and Francis, F., J., *J. Food Sciences*, **33**, 471-477 (1968).
- 107.- Kenjiro, T., et al., *Phytochemistry*, **42**, 1055-1057 (1996).
- 108.- Toki, K., et al., *Phytochemistry*, **39**, 243 (1995).
- 109.- Riberán-Gayon, P., « The Anthocyanins of Grapes and Wines », in: Anthocyanins as Food Color, (Markarkis, P., Ed.), Academic Press, N.Y. (1982).
- 110.- Valls, J., et al., Unidad de Enología, Dpto. de Bioquímica y Biotecnología Universidad Rovira i Virgili (Tarragona).
- 111.- Leighton, F., Urquiaga, I., Diez, M., (Presentación a la 77ª Asamblea General de la IV y al XXII Congreso Mundial de la Vid y del Vino, Buenos Aires, Diciembre 1, 1997).
- 112.- Chance, B., et al. *Physiol. Rev.*, **59**, 527-605 (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organisms.
- 113.- Sohal, R., S. and Weindruch, R., *Science*, **273**, 59-63, (1996). Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. .
- 114.- Rice-Evans, C., A., *Science*, **2**, 152-159 (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends in Plant.
- 115.- Leger, A., S., et al., *Lancet*, i: 1017-1020 (1979). Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine.

- 116.- Gerritsen, M., E., Am. J. Pathol., **147**, 278-292 (1995).Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression.
- 117.- Wiseman, H. and Halliwell, B., Biochem. J., **313**, 17-19, (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer.
- 118.- Campos, A., Lissi, E., Nutrition, Research, **16**, 385-389, (1996). Total Antioxidant Potential of Chilean Wines.
- 119.- Campos, A., M., et al., J. Braz. Chem. Soc., **7**, 43-49 (1996). The Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) and Total Antioxidant Reactivity (TAR) of Ilex paraguayensis Extracts and Red Wine.
- 120.- Whitehead, T., P., Clin. Chem., **41**, 32-35 (1995). Effect of Red Wine Ingestion on the Antioxidant Capacity of Serum.
- 121.- Frankel, E., N., Lipid Technology, **7**, 77-80 (1995). Natural and biological antioxidants in foods and biological systems. Their mechanism of action, applications and implications.
- 122.- Frankel, E. N., et al., J Agric. Food Chem., **43**, 890-894 (1995). Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins.
- 123.- Ursini, F., et al., Health. Udine 9-11, (1996). Wine Antioxidants: Effects in vitro and in vivo. Wine and Human.
- 124.- Asem, S., et al., Phytochemistry, **10**, 171-175 (1971).
- 125.- Swain T.(1976). « In Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments»(Goodwing T.W. Eds). Academic Press. London and New York.
- 126.- Stringheta Paulo César Dr. Prof. Titular da Universidade de Viosa. Copigmentação de **Antocianinas** Uso de corantes naturais em alimentos processados
www.biotecnologia.com.br/bio/bio14/14_g.asp
- 127.- <http://www.aiab.it/bioagricultura/articolo.php?articolo=100>

ANEXOS

ANEXO N° 1

Aditivos colorantes sintéticos para alimentos certificados por la FDA*

Número FD&C	Nombre común	Clase química	Características
FD&C azul N°1	Azul brillante	Trifenilmetano	Estable al calor inestable a la luz
FD&C azul N°2	Indigotina	Indigoide	Estable a la luz Inestable al agua
FD&C verde N°3	verde sólido	Trifenilmetano	verde azulado
	Naranja B	Azo	Uso restringido a envolturas de salchichas
	Rojo cítrico N°2	Azo	Uso restringido a la cáscara de naranja
FD&C rojo N°3	Eritrosina	Xanteno	Estable al calor Inestable a la luz
FD&C rojo N°40	Rojo altura	Azo	Inestable a los agentes redox
FD&C amarillo N°5	Tartrazina	Azo	Buena estabilidad al calor y a luz
FD&C amarillo N°6	Amarillo ocaseo	Azo	Estabilidad regular al calor y a la luz

* La Food and Drug Administration (FDA) regula los aditivos colorantes con la autoridad de la Enmienda relativa a Aditivos Colorantes de la Ley Federal sobre Alimentos, Medicamentos y Cosméticos. Los colorantes para alimentos son clasificados por dicha dependencia como certificados o exentos de certificación (2 y 3)

ANEXO N° 2

Colores exentos de Certificación aprobados por la FDA

Aditivo colorante : color	Fuente	Usos
Extracto de achiote: amarillo	Semillas del árbol de Bixa Orellana	Queso productos Productos horneados
Remolacha deshidratadas: rojo	Remolachas	Productos lácteos rellenos de frutas
Azul ultramar		
Cantaxantina: naranja rojizo	Síntesis	
Caramelo: café a café oscuro	Calentamiento de jarabe de maíz	Refrescos Productos horneados
β -apo-8'-carotenal: rojo naranja	Sintético	
β -caroteno: amarillo	Sintético y algas	Margarina
Carmín de cochinilla: naranja	Hembra de insecto cochinilla	Bebidas, salchichas
Harina de semilla de algodón		
Gluconato ferroso		
Extracto de color de uva: rojo a púrpura	Uvas Concord	Jaleas, dulces
Extracto de hollejos de uva	Hollejos de uva	Bebidas
Óxido de hierro		
Jugo de fruta	Diversas verduras	
Jugo de verduras	Diversas verduras	
Harinas de algas secas		
Tagetes ("flor de muerto")		
Aceite de zanahoria	Zanahorias	
Aceite de endospermo de maíz	Endospermo de maíz	
Paprika: rojo naranja	Pimientos rojos	
Oleoresina de paprika:rojo naranja	Pimientos rojos	Carnes desmenuzada aderezos
Riboflavina: amarillo	Sintético	
Azafrán: Amarillo	Planta del Crocus Sativos	Sopas, productos horneados, lácteos
Dióxido de titanio: blanco	Ilmenita (mineral)	Aderezo de ensalada
Tumérico: amarillo	Planta de la Cúrcuma Longa L.	
Oleoresina de tumérico: amarillo	Planta de la Cúrcuma Longa L.	

ANEXO N° 3

Descripción de los colorantes naturales de mayor aplicación (4 - 10)

1.- Curcumina

Origen

Es el colorante de la cúrcuma, especia obtenida del rizoma de la planta del mismo nombre cultivada en la India.

Usos

- La especia es un componente fundamental del curry, al que confiere su color amarillo intenso característico.
- Colorante de mostazas.
- Preparados para sopas y caldos.
- Productos cárnicos.
- Colorante tradicional de derivados lácteos.

Dosificación

Se puede utilizar sin más límite que la buena práctica de fabricación en muchas aplicaciones, con excepciones como las conservas de pescado, en las que el máximo legal es 200 mg/kg, las conservas vegetales y el yogur, en las que es 100 mg/kg, y en el queso fresco, en el que este máximo es sólo 27 mg/Kg.

2.- Riboflavina

Origen

La riboflavina es una vitamina del grupo B, concretamente la denominada B2. Es la sustancia que da color amarillo al suero de la leche.

Usos

Este aditivo es relativamente poco utilizado. En España se limita su uso en el yogur a 100 mg/kg y en las conservas de pescado a 200 mg/kg

3.- Cochinilla, ácido carmínico

Origen

El ácido carmínico, una sustancia química compleja, se encuentra presente en las hembras con crías de ciertos insectos de la familia Coccidae, parásitos de algunas especies de cactus

Usos

Confiere a los alimentos a los que se añade un color rojo muy agradable, utilizándose en conservas vegetales y mermeladas (**hasta 100 mg/kg**), helados, productos cárnicos y lácteos, como el yogur y el queso fresco (**20 mg/Kg de producto**) y bebidas, tanto alcohólicas como no alcohólicas (11).

4.- **Clorofilas**

Complejos cúpricos de clorofilas y clorofilinas

Las clorofilas son los pigmentos responsables del color verde de las hojas de los vegetales y de los frutos inmaduros. Son piezas claves en la fotosíntesis, proceso que permite transformar la energía solar en energía química, y finalmente a partir de ella producir alimentos para todos los seres vivos y mantener el nivel de oxígeno en la atmósfera. Por esta razón han sido estudiadas muy extensamente. Se ha dicho de ellas que son las sustancias químicas más importantes sobre la superficie de la Tierra. Las plantas superiores tienen dos tipos de clorofila muy semejantes entre ellas, denominadas a y b, siendo la primera la mayoritaria y la que se degrada más fácilmente. Son químicamente muy complicadas, y solo en 1940 se pudo averiguar su estructura completa. Incluyen un átomo de magnesio dentro de su molécula. El interés por la clorofila en tecnología alimentaria no estriba tanto en su uso como aditivo sino en evitar que se degrade durante el procesado y almacenamiento la que está presente en forma natural en los alimentos de origen vegetal. El calentamiento hace que las clorofilas pierdan el magnesio, transformándose en otras sustancias llamadas feofitinas y cambiando su color verde característico por un color pardo oliváceo mucho menos atractivo. Este efecto puede producirse en el escaldado de las verduras previo a su congelación, en el enlatado, etc. También le afecta el oxígeno, la luz y la acidez, resistiendo mal además los periodos de almacenamiento prolongados. Las clorofilas, que en los vegetales se encuentran dentro de ciertos orgánulos, son insolubles en agua pero solubles en alcohol, con el que pueden extraerse. Las clorofilinas son derivados algo más sencillos obtenidos por rotura parcial de las clorofilas. La substitución del magnesio por cobre da lugar al colorante, cuyo color es mucho más estable. Las clorofilas se utilizan poco como aditivos alimentarios, solo ocasionalmente en aceites, chicle, helados y bebidas refrescantes, en sopas preparadas y en productos lácteos. Su empleo está limitado, en el queso a 600 mg/Kg, solo el E-140, y en algunas conservas vegetales y yogures a 100 mg/Kg. Estos colorantes se absorben muy poco en el tubo digestivo. No se ha establecido un límite máximo a la ingestión diaria de la clorofila utilizada como aditivo, ya que esta cantidad es despreciable frente a la ingerida a partir de fuentes naturales. La ingestión admisible del colorante E-141 es de hasta 15 mg/Kg de peso y día, debido a su contenido en cobre (4-6% del peso de colorante). Una cantidad elevada de cobre puede ser muy tóxica. Sin embargo, las dietas occidentales habituales son usualmente deficitarias más que excedentarias en co-

bre, por lo que la pequeña cantidad que puede aportar este colorante en un uso normal sería probablemente más beneficiosa que perjudicial(12).

5.- Carotenoides

α , β , γ - carotenos

Bixina, norbixina(Rocou, Annato)

Capsantina,capsorrubina

Licopeno

β -apo-8'-carotenal

Ester etílico del ácido β -apo-8'-carotenoico

Los carotenoides y las xantófilas son un amplio grupo de pigmentos vegetales y animales, del que forman parte más de 450 sustancias diferentes, descubriéndose otras nuevas con cierta frecuencia. Se ha calculado que la naturaleza fabrica cada año alrededor de 100 millones de toneladas, distribuidas especialmente en las algas y en las partes verdes de los vegetales superiores. Alrededor del 10% de los diferentes carotenoides conocidos tiene actividad como vitamina A en mayor o menor extensión. Alrededor del 10% de los diferentes carotenoides conocidos tiene mayor o menor actividad como vitamina A. Los carotenoides utilizados en la fabricación de alimentos se pueden obtener extrayéndolos de los vegetales que los contienen (el aceite de palma, por ejemplo, contiene un 0,1%, que puede recuperarse en el refinado) o, en el caso del beta-caroteno, β -apo-8'-carotenal y ester etílico al ácido β -apo-8'-carotenoico, por síntesis química. Los dos últimos no existen en la naturaleza. La bixina y la norbixina se obtienen de extractos de la planta conocida como bija, rocou o annato (Bixa orellana). Son compuestos algo diferentes químicamente entre ellos, siendo la bixina soluble en las grasas e insoluble en agua y la norbixina a la inversa. Se han utilizado desde hace muchos años para colorear productos lácteos, y su color amarillo puede aclararse por calentamiento, lo que facilita la obtención del tono adecuado. La capsantina es el colorante típico del pimiento rojo y del pimentón, siendo España el principal productor mundial. Sus aplicaciones en la fabricación de embutidos son de sobra conocidas. El licopeno es el colorante rojo del tomate y los carotenos están distribuidos muy ampliamente entre los vegetales, especialmente el beta-caroteno, que es también el colorante natural de la mantequilla. No son muy solubles en las grasas, y, con la excepción de la norbixina, prácticamente nada en agua. Cuando se utilizan para colorear bebidas refrescantes (el β -caroteno especialmente, para las bebidas de naranja), es en forma de suspensiones desarrolladas específicamente con este fin. Tienen la ventaja de no verse afectados, como otros colorantes, por la presencia de ácido ascórbico, el calentamiento y la congelación, así como su gran potencia colorante, que ya resulta sensible a niveles de una parte por millón en el alimento. Sus principales inconvenientes son que son

caros y que presentan problemas técnicos durante su utilización industrial, ya que son relativamente difíciles de manejar por su lentitud de disolución y por la facilidad con que se alteran en presencia de oxígeno. Pierden color fácilmente en productos deshidratados, pero en cambio resisten bien el enlatado. Algunos de ellos (el beta-caroteno y el β -apo-8'-carotenal, especialmente y, mucho menos, el E-160 f) tienen actividad como vitamina A, en la que se pueden transformar en el organismo. La ingestión de cantidades muy elevadas de esta vitamina puede causar intoxicaciones graves. Sin embargo, las dosis necesarias para originar este efecto quedan muy por encima de las que podrían formarse a partir de los carotenoides concebiblemente presentes como aditivo alimentario. La ingestión diaria admisible según el comité FAO/OMS es de hasta 0,065 mg/Kg de peso en el caso del E-160 B y de 5 mg/Kg de peso en los E-160 e y E-160 f. Se han descrito algunos casos, raros, de alergia al extracto de bija. La legislación española autoriza el uso del caroteno sin límites para colorear la mantquilla y la margarina, 0,1 g/kg en el yogur, 200 mg/kg en conservas de pescado, 300 mg/kg en los productos derivados de huevos, conservas vegetales y mermeladas, y hasta 600 mg/kg en quesos. En sus aplicaciones en bebidas refrescantes, helados y productos cárnicos no tiene limitaciones. En Estados Unidos solo se limita el uso del E-160 e (0,015 g/libra). Los carotenoides son cada vez más usados en tecnología alimentaria a pesar de los problemas que se han indicado, especialmente ante las presiones ciudadanas contra los colorantes artificiales. Esto es especialmente notable en el caso de las bebidas refrescantes. También se está extendiendo en otros países la utilización del colorante del pimentón y de la propia especia. Desde hace algunos años se ha planteado la hipótesis de que el β -caroteno, o mejor, los alimentos que lo contienen, pueden tener un efecto protector frente a ciertos tipos de cáncer. Los datos epidemiológicos parecen apoyarla, pero la complejidad del problema hace que aún no se puedan indicar unas conclusiones claras, ni mucho menos recomendar la ingestión de dosis farmacológicas de esta sustancia (13 y 14).

6.- Xantófilas

Flavoxantina

Luteína

Criptoxantina

Rubixantina

Violoxantina

Rodoxantina

Cantaxantina

Las xantófilas son derivados oxigenados de los carotenoides, usualmente sin ninguna activi-

dad como vitamina A. La criptoxantina es una excepción, ya que tiene una actividad como vitamina A algo superior a la mitad que la del beta-caroteno. Abundan en los vegetales, siendo responsables de sus coloraciones amarillas y anaranjadas, aunque muchas veces éstas estén enmascaradas por el color verde de la clorofila. También se encuentran las xantófilas en el reino animal, como pigmentos de la yema del huevo (luteína) o de la carne de salmón y concha de crustáceos (cantaxantina). Esta última, cuando se encuentra en los crustáceos, tiene a veces colores azulados o verdes al estar unida a una proteína. El calentamiento rompe la unión, lo que explica el cambio de color que experimentan algunos crustáceos al cocerlos. La cantaxantina utilizada como aditivo alimentario se obtiene usualmente por síntesis química. La cantaxantina era el componente básico de ciertos tipos de píldoras utilizadas para conseguir un bronceado rápido. La utilización de grandes cantidades de estas píldoras dio lugar a la aparición de problemas oculares en algunos casos, por lo que, con esta experiencia del efecto de dosis altas, se tiende en algunos países a limitar las cantidades de este producto que pueden añadirse a los alimentos. Por ejemplo, en Estados Unidos el límite es de 30 mg/libra. En España, las xantófilas se utilizan para aplicaciones semejantes a las de los carotenoides (excepto en el queso), con las mismas restricciones. Estos colorantes tienen poca importancia como aditivos alimentarios directos. Únicamente la cantaxantina, de color rojo semejante al del pimentón, se utiliza a veces debido a su mayor estabilidad. Son en cambio muy importantes como aditivos en el alimento suministrado a las truchas o salmones criados en piscifactorías, y también en el suministrado a las gallinas. El objetivo es conseguir que la carne de los peces o la yema de los huevos tenga un color más intenso. El colorante utilizado en cada caso concreto depende de la especie animal de que se trate, y suele aportarse en forma de levaduras del género *Rhodotorula* o como algas *Spirulina*, más que como sustancia química aislada (15).

7.- Rojo de remolacha, betanina, betalaína

Este colorante consiste en el extracto acuoso de la raíz de la remolacha roja (*Beta vulgaris*). Como tal extracto, es una mezcla muy compleja de la que aún no se conocen todos sus componentes. A veces se deja fermentar el zumo de la remolacha para eliminar el azúcar presente, pero también se utiliza sin más modificación, simplemente desecado. Aunque este colorante resiste bien las condiciones ácidas, se altera fácilmente con el calentamiento, especialmente en presencia de aire, pasando su color a marrón. El mecanismo de este fenómeno, que es parcialmente reversible, no se conoce con precisión. Se absorbe poco en el tubo digestivo. La mayor parte del colorante absorbido se destruye en el organismo, aunque en un cierto porcentaje de las personas se elimina sin cambios en la orina. Ante la preocupación del público por el uso de colorantes artificiales, el rojo de remolacha está ganando aceptación,

especialmente en productos de repostería, helados y derivados lácteos dirigidos al público infantil. En España se utiliza en bebidas refrescantes, conservas vegetales y mermeladas (300mg/kg), conservas de pescado (200mg/kg), en yogures (hasta 18 mg/Kg) y en preparados a base de queso fresco, hasta 250 mg/Kg. No se conocen efectos nocivos de este colorante y la OMS no ha fijado un límite a la dosis diaria admisible.

8.- Antocianos

Son un grupo amplio de sustancias naturales, bastante complejas, formadas por un azúcar unido a la estructura química directamente responsable del color. Son las sustancias responsables de los colores rojos, azulados o violetas de la mayoría de las frutas y flores. Usualmente cada vegetal tiene de 4 a 6 distintos, pero algunos tienen prácticamente uno solo (la zarzamora, por ejemplo) o hasta 15. No existe una relación directa entre el parentesco filogenético de dos plantas y sus antocianos.

Los antocianos utilizados como colorante alimentario deben obtenerse de vegetales comestibles. La fuente más importante a nivel industrial son los subproductos (hollejos, etc.) de la fabricación del vino. Los antocianos son los colorantes naturales del vino tinto, y en algunos casos permiten distinguir químicamente el tipo de uva utilizado. Son, evidentemente, solubles en medio acuoso. El material extraído de los subproductos de la industria vinícola, denominado a veces «enocianina», se comercializa desde 1879, y es relativamente barato. Los otros antocianos, en estado puro, son muy caros.

Los antocianos son sustancias relativamente inestables, teniendo un comportamiento aceptable únicamente en medio ácido. Se degradan, cambiando el color, durante el almacenamiento, tanto más cuanto más elevada sea la temperatura. También les afecta la luz, la presencia de sulfitos (E-220 y siguientes), de ácido ascórbico y el calentamiento a alta temperatura en presencia de oxígeno. El efecto del sulfito es especialmente importante en el caso de los antocianos naturales de las frutas que se conservan para utilizarlas en la fabricación de mermeladas.

Se utilizan relativamente poco, solamente en algunos derivados lácteos, helados, caramelos, productos de pastelería y conservas vegetales (hasta 300 mg/kg), aunque están también autorizados en conservas de pescado (200 mg/kg), productos cármicos, licores, sopas y bebidas refrescantes. Como los demás colorantes naturales, en bastantes casos no tienen más limitación legal a su uso que la buena práctica de fabricación, aunque esta situación tiende a cambiar progresivamente. Cuando se ingieren, los antocianos son destruidos en parte por la flora intestinal. Los absorbidos se eliminan en la orina, muy poco, y fundamentalmente en la bilis, previas ciertas transformaciones. En este momento son sustancias no del todo conocidas, entre otras razones por su gran variedad, siendo objeto actualmente de muchos estudios.

La ingestión diaria de estas sustancias, procedentes en su inmensa mayoría de fuentes naturales, puede estimarse en unos 200 mg por persona (16, 17).

COLORANTES ARTIFICIALES

Como ya se ha indicado, el coloreado artificial de los alimentos es una práctica que data de la antigüedad, pero alcanzó su apogeo con el desarrollo en el siglo XIX de la industria de los colorantes orgánicos de síntesis; ya en 1860 se coloreaba el vino en Francia con fucsina; más adelante se colorearon los macarrones y la mantequilla con dinitrocresol, etc. En los últimos años la preocupación por la seguridad de los alimentos, y la presión del público, ha llevado a muchas empresas a revisar la formulación de sus productos y substituir cuando es tecnológicamente factible los colorantes artificiales por otros naturales. Además, aunque en general son más resistentes que los colorantes naturales, los colorantes sintéticos presentan también problemas en su uso; por ejemplo, en muchos casos se decoloran por acción del ácido ascórbico, efecto importante en el caso de las bebidas refrescantes, en que esta sustancia se utiliza como antioxidante. Los colorantes artificiales pueden utilizarse en forma soluble, como sales de sodio y potasio, y a veces amonio, en forma insoluble como sales de calcio o aluminio, o bien adsorbidos sobre hidróxido de aluminio formando lo que se conoce como una laca. La utilización de un colorante soluble o insoluble depende de la forma en que se va a llevar a cabo la dispersión en el alimento.

Precisamente la preocupación por su seguridad ha hecho que los colorantes artificiales hayan sido estudiados en forma exhaustiva por lo que respecta a su efecto sobre la salud, mucho más que la mayoría de los colorantes naturales. Ello ha llevado a reducir cada vez más el número de colorantes utilizables, aunque al contrario de lo que sucede en los otros grupos de aditivos, existan grandes variaciones de un país a otro. Por ejemplo, en los Países Nórdicos están prohibidos prácticamente todos los artificiales, mientras que en Estados Unidos no están autorizados algunos de los que se usan en Europa pero sí lo están otros que no se utilizan aquí.

En España la cantidad total de colorantes artificiales está limitada, en general, a entre 100 y 300 mg/Kg en cualquier producto alimentario sólido, dependiendo de cual sea, y a 70 mg/lit en bebidas refrescantes. Además cada colorante tiene por sí mismo un límite que varía según la sustancia de que se trate y del alimento en el que se utilice. La tendencia actual es a limitar mas aún tanto los productos utilizables como las cantidades que pueden añadirse (18).

COLORANTES AZOICOS

Estos colorantes forman parte de una familia de sustancias orgánicas caracterizadas por la presencia de un grupo peculiar que contiene nitrógeno unido a anillos aromáticos. Todos se obtienen por síntesis química, no existiendo ninguno de ellos en la naturaleza. El número de los colorantes de este grupo autorizados actualmente es pequeño en comparación con los existentes, muchos de los cuales se utilizaron antiguamente y luego se prohibieron por su efecto potencialmente perjudicial para la salud. Este hecho es importante sobre todo en los colorantes para grasas, siendo un ejemplo típico el denominado «**amarillo mantequilla**», utilizado hace tiempo para colorear este alimento. En 1918 se introdujo en Estados Unidos, pero se prohibió el mismo año al afectar a los obreros que lo manejaban. En otros países, especialmente en Japón, se utilizó hasta los años 40, cuando se demostraron incuestionablemente sus propiedades como agente carcinógeno. Este colorante se absorbe en una gran proporción y se metaboliza en el hígado. No existen datos que permitan sospechar que lo mismo suceda en el caso de los que se utilizan actualmente, que tienen como característica general la de absorberse muy poco en el intestino, siendo destruidos en su mayoría por la flora bacteriana intestinal. Los fragmentos de colorante que si son asimilados se eliminan por vía urinaria y/o biliar.

Se les ha acusado de ser capaces de producir reacciones de sensibilidad en personas alérgicas a la aspirina, aunque esto solo se ha demostrado, en algunos casos, para uno de ellos, la tartrazina. También se les ha acusado sin demasiado fundamento de provocar alteraciones en el comportamiento y aprendizaje en los niños (19).

ANEXO N^o 4

Ocurrencia natural de antocianidinas. Los compuestos están ordenados primero por el número de grupos hidroxilo y otros grupos en el anillo A y luego por el número de sustituyentes en el anillo B(125).

Nombre trivial	ANILLO A			ANILLO B			FUENTES
	hidroxilación		otros	3'	5'	7'	
	5	7					
3-dexosiantocianidinas							
Apigenidina	OH	OH	-	-	OH	-	Rechsteineria
Luteolinidina	OH	OH	-	OH	OH	-	Rechsteineria
Tricetinidina	OH	OH	-	OH	OH	OH	Camelia
Columnidina	OH	OH	-	-	-	-	Columnnea
Antocianidinas							
ninguno*	-	OH	-	-	OH	-	Acacia
Fisetinidina	-	OH	-	OH	OH	-	Acacia
Robitenidina	-	OH	-	OH	OH	OH	Robinia
Pelargonidina	OH	OH	-	-	OH	-	Pelargonium
Cianidina	OH	OH	-	OH	OH	-	Centaurea
Peonidina	OH	OH	.	OMe	OH	-	Paeonia
Rosinidina	OH	OH	7-OMe	OMe	OH	-	Primula
Delfinidina	OH	OH	-	OH	OH	OH	Delphinium
Petunidina	OH	OH	-	OMe	OH	OH	Petunia
Malvidina	OH	OH	-	OMe	OH	OMe	Malva
Hirsutinidina	OH	OH	OMe	OMe	OH	OMe	Primula

* No existe como glicósido y es formado a partir de prontoantocianinas.

ANEXO 5

Algunos ejemplos de antocianinas y su ocurrencia natural(23).

Nombre científico / Nombre común /Ocurrencia	Antocianidinas o Antocianinas presentes
<i>Allium Cepa</i> / cebolla / bulbos	Cy-3-glucósido , 3-laminaribiósido
<i>Berberis vulgaris</i> / Agracejo / hojas	Cy , Pn , Dp-3-glucósidos
<i>Brassica Oleraceae</i> / Calabaza roja / hojas	Cy-3-soforósido-5-glucósido acilados con malonil , <i>p</i> -coumaroil, di- <i>p</i> -coumaroil , feruloil , diferuloil , sinapoil , disinapoil
<i>Cyphomandra betaceae</i> / berenjena / piel o cáscara	Cy , Pg , Dp-3-glucósidos y 3-rutinósidos
<i>Cynara Scolymus</i> / Alcachofa / frutos	Cy-3-cafeoilglucósido, 3-cafeoilsoforósido 3-dicafeoilsoforósido
<i>Citrus sinensis</i> / Naranja/ piel o cáscara	Cy y Dp-3-glucósidos
<i>ficus carica</i> / higo/epidermis frutos	Pg-3-ramnoglucósidos, Cy-3-glucósido, 3-ramnoglucósido , 3,5-diglucósido
<i>Fragaria spp</i> / fresa / frutos	Pg y Cy-3-glucósidos
<i>Mangifera indica</i> mango / fruto	Pn-3-galactósido
<i>Morus nigra</i> / mora / frutos	Cy-3-glucósidos
<i>Olea europea</i> / aceituna / frutos	Cy-3-glucósidos
<i>Malus pumila</i> / manzana / piel o cáscara	Cy-3-glucósido , 3-xilósido , 3-galactósido 3 y 7-arabinósidos , libres y acilados
<i>Passiflora edulis</i> maracuyá / frutos	Cy-3-glucósido

///...

Continuación del Anexo N° 5

Nombre científico / Nombre común /Ocurrencia	Antocianidinas o Antocianinas presentes
<i>P. quadrangularis</i> / tumbo / flores	Dp , Pt , Mv-3-glucósidos , 3,5-diglucósidos
<i>Prunus avium</i> / cereza / frutos	Cy , Pn-3-glucósidos y 3-rutinósidos
<i>Punica granatum</i> / granada / frutos	Cy , Dp , Pt - 3 - glucósidos , 3,5-diglucósidos, Pg-3,5-diglucósidos
<i>Raphanus sativas</i> / rabanito / raíces	Pg ,Cy-3-soforósido-5-glucósido acilados con p-coumaroil ,feruloil y cafeoil ésteres
<i>Schimus molle</i> / molle / frutos	Cy-3-galactósido,3-rutinósido, Pn-3-glucósido
<i>Sambucus nigra</i> / sauco / frutos	Cy-3-(2-1-xilosilglucósido),sambucianina
<i>Solanum tuberosum</i> / papa / tubérculos	Pg , Dp ,Pt , -3-rutinósidos ; Pg , Pn , Pt Mv-3(p-coumaroilrutinósidos)-5-glucósidos
<i>Vitis vinífera</i> / Uva / frutos	Cy , Pn , Pt , Mv , Dp - 3 - glucósidos, 3- <i>p</i> -coumaroilglucósidos , 3 , 5 - diglucósido; Mv - 3 , 5 - acetildiglucósido
<i>Zea mays</i> / Maíz morado/ mazorca	Cy ,Pg , Pn - 3 - glucósidos , Cy - 3 - galactósido , libres acilados

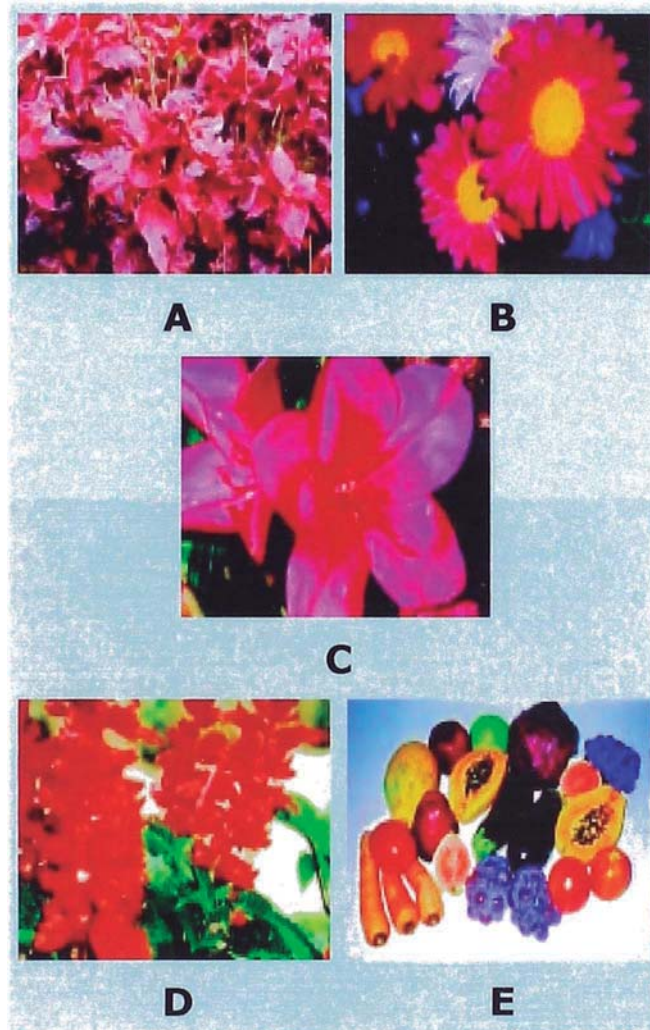
ANEXO N° 6(126)

Figura N° 1.- Plantas que contienen partes pigmentadas:
(a) *Acalypha wilkesiana*,
(b) *Callistephus chinensis* Nees,
(c) *Rhododendron x simsii* Panch,
(d) *Salvia Splendens* Ker-Gawl;
(e) Frutas y hortalizas .

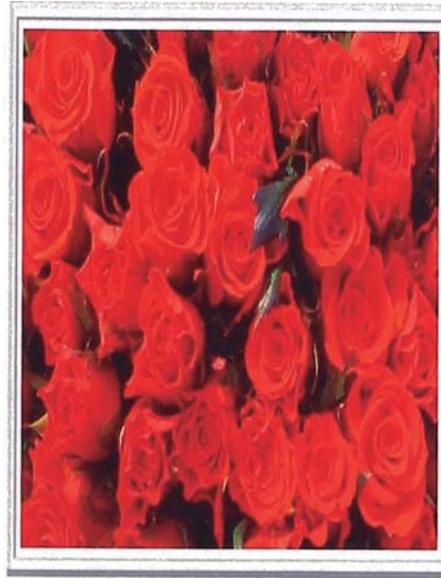


Figura N° 2.- Rosas rojas y rosadas y sus extractos (23)

Variedades Exóticas



Lipstick ▶



Blue bird ▶



Miracle ▶



Amarillas ▶



Rosadas ▶

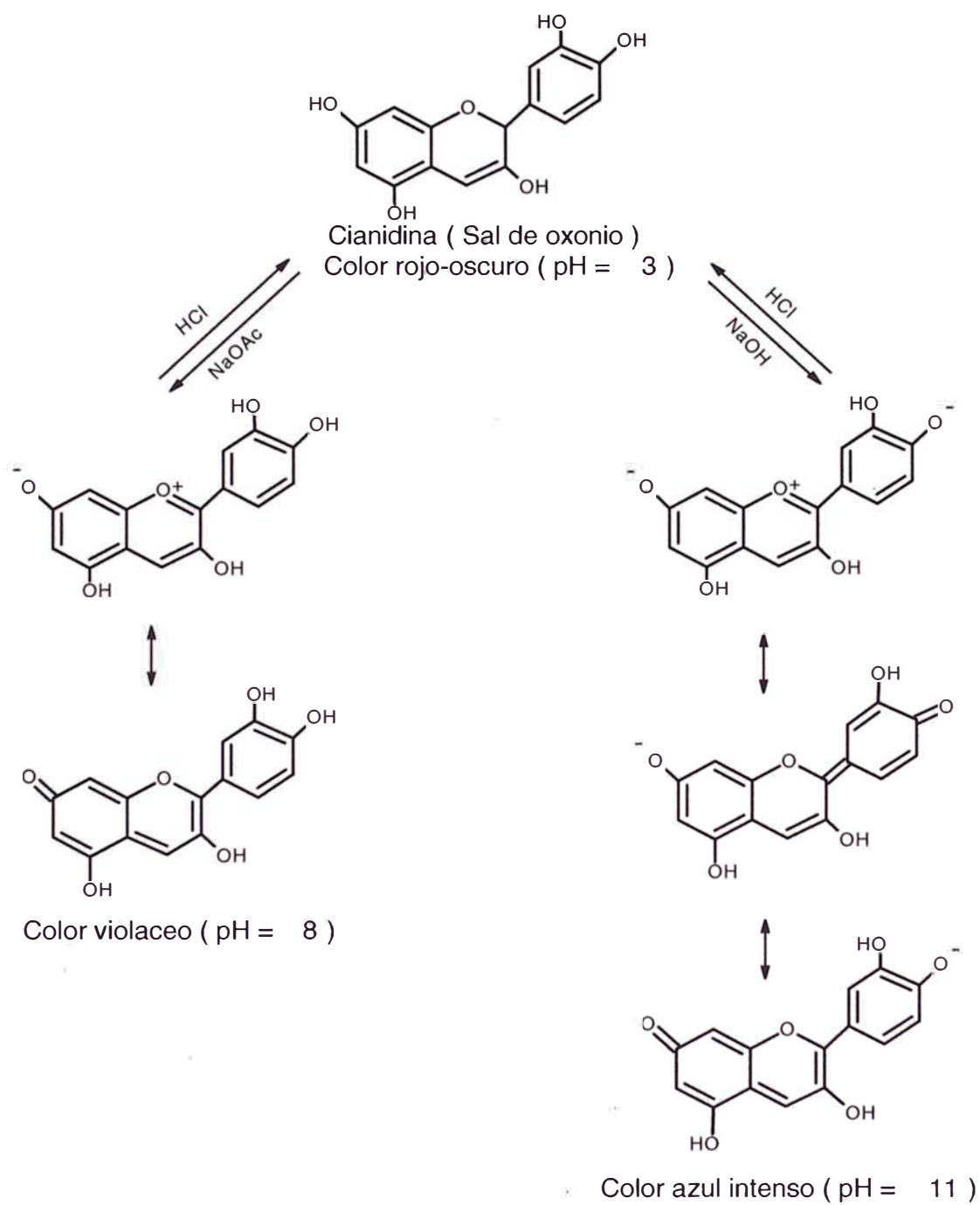


Salmón ▶

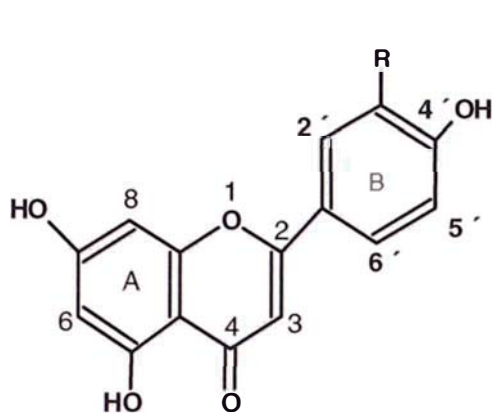
Figura N° 3.- Variedades de rosas cuyo color están determinadas por el tipo de antocianinas y/o el pH del medio.

ANEXO N°7

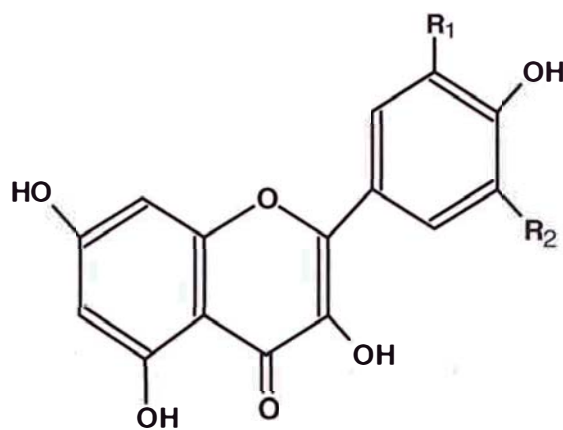
Cambios de color de la cianidina en función del pH (23)



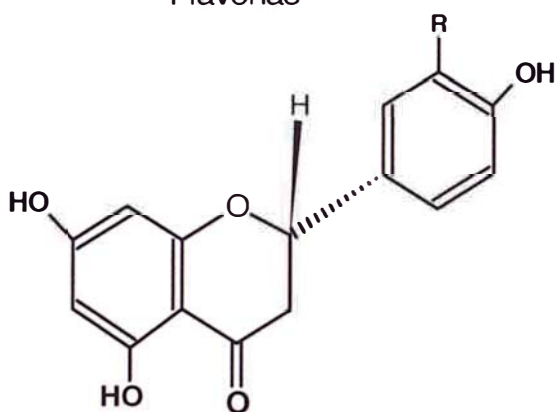
ANEXO N°8
Estructura general de los derivados de los flavonoides



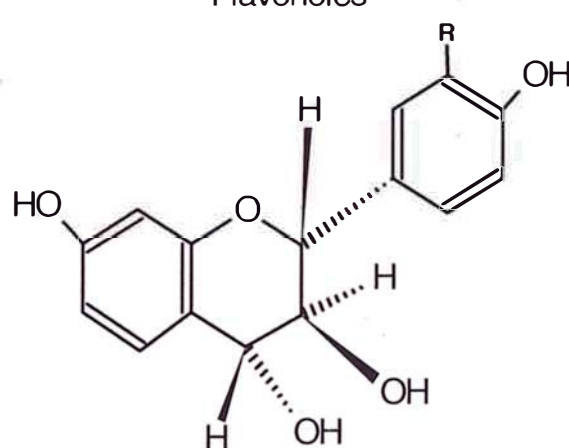
Flavonas



Flavonoles

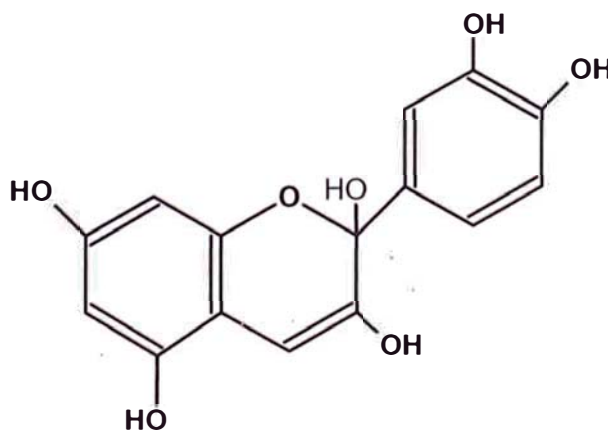


Flavanonas



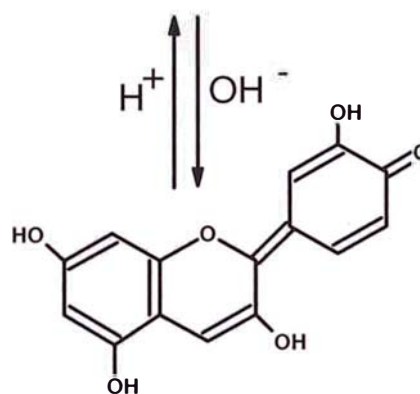
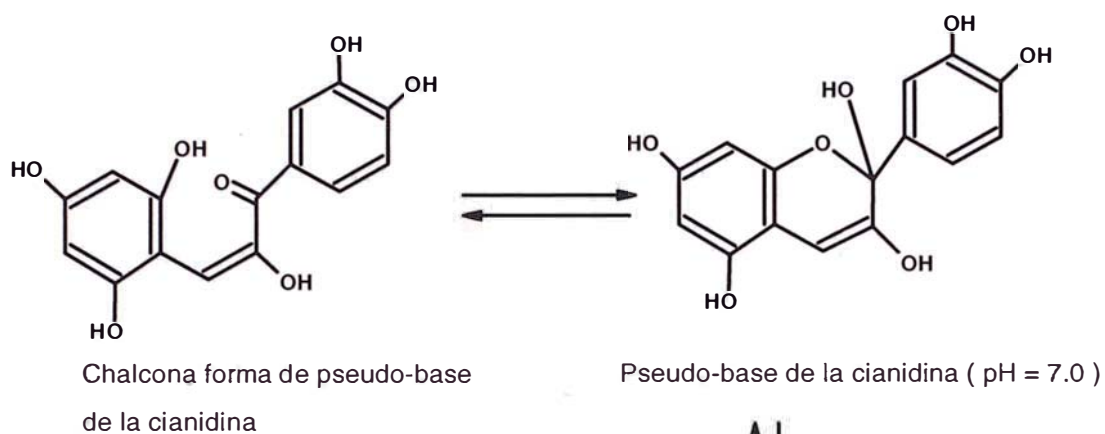
3,4 - Flavandioles o Proantocianidinas

Estructura de la pseudo-base de la cianidina (pH = 7)



ANEXO 9

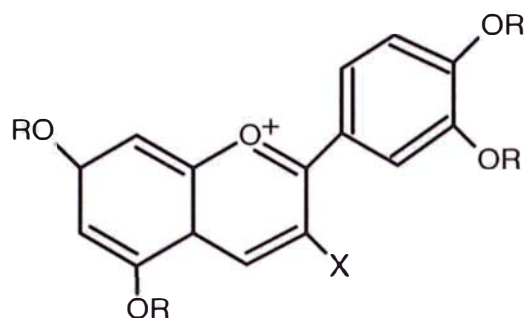
Interconversiones de la cianidina en función del pH



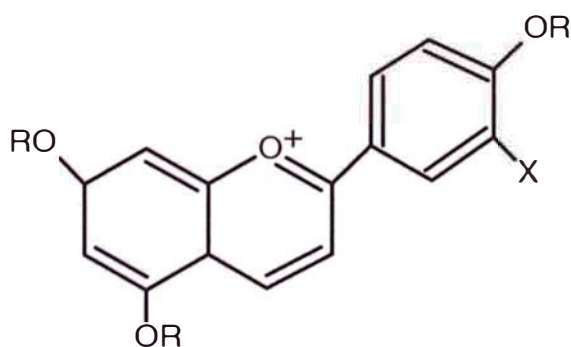
Una forma tautomérica de la anhidro-base de la cianidina (pH > 9.0)

ANEXO N° 10

Efectos de la estructura sobre la vida media (τ) de flavilios coloreados, medidos a sus λ_{\max} en ácido cítrico 0,01 M, pH=2,8 y temperatura ambiente(48).



X	R	τ (dias)	λ_{\max} (nm)
OH	CH ₃	0,04	512
OH	H	0,5	512
OCH ₃	CH ₃	6	512
O-rutinosa	CH ₃	13	512
O-rutinosa	H	65	512

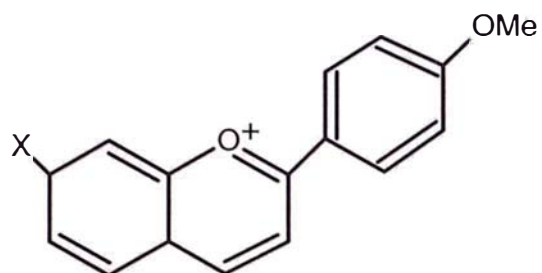


X	R	τ (dias)	λ_{\max} (nm)
OCH ₃	CH ₃	170	488
H	H	400	475

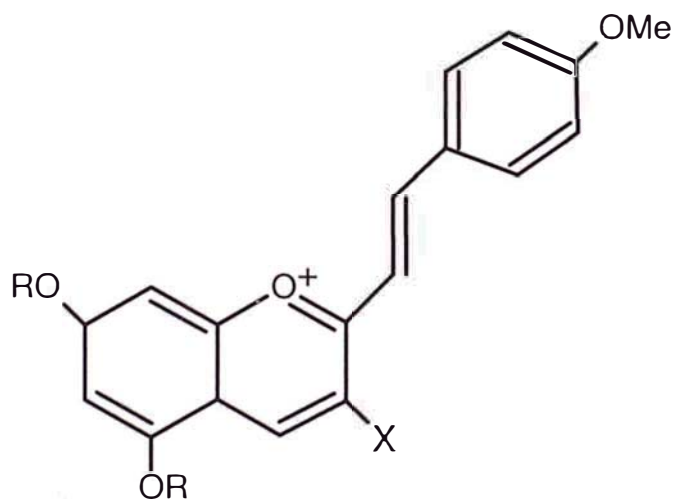
...///

///...

Continuación del Anexo N°10



X	R	τ (dias)	λ_{\max} (nm)
OH	OH	400	458
H	OH	400	436
H	OCH ₃	35	437
OH	H	300	428
OCH ₃	H	8	427



X	R	τ (dias)	λ_{\max} (nm)
		50	506

ANEXO N° 11

Copigmentación de la cianidina-3,5-diglucósido ($2 \cdot 10^{-3}$ M) a pH=3,32(126)

COPIGMENTO $6 \cdot 10^{-3}$ M	λ max nm	$\Delta\lambda$ max nm	A	% incremento de A a λ max
Sin copigmento	508	-	0,5	-
Ácidos cinámicos				
Ácido Cafeico	515	7	0,78	56
Ácido Ferúlico	517	9	0,80	60
Ácido clorogénico	513	5	0,875	75
Dihidrochalcona				
(+)-catequina	514	6	0,89	79
Flavona				
Apigenidina-7-glucósido	517	9	0,84	68
Flavononas				
Hesperidina	512	13	1,095	119
Naringina	518	10	0,985	97
Flavonoles				
Kaemferol-3-glucósido	530	22	1,693	239
Quercitina-3-ramnósido quercitina	527	19	1,599	217
Quercitina-3-rutinósido rutina	528	20	1,643	228

ANEXO Nº 12

Artículo de caretas Ed. Nº 1685 (29-08-01)

Milagro Morado

Investigaciones japonesas revelan que el maíz morado es la nueva arma natural contra el cáncer de colon.



En chicha o mazamorra, protege del cancer.

EL maíz, fruto sagrado de los incas, sigue dando sorpresas. Esta vez se trata de la variedad morada, aquella que es la base de nuestra famosa chicha morada y su hermana la mazamorra. En la Universidad de Nagoya, Japón, un grupo de investigadores de la Facultad de Medicina, encabezados por el profesor Tomoyuki Shirai, ha establecido que el pigmento del maíz morado evita la aparición del cáncer de intestino grueso.

El estudio no puede ser más promisorio para la sostenida batalla contra el cáncer, sino también por su impacto en la economía nacional. El Perú es el único país con sembríos comerciales de maíz morado. Se estiman en 5,000 a 6,000 las hectáreas sembradas con una producción de 3 a 6 toneladas por hectárea. Sin embargo, estas cifras resultan ínfimas si se las compara con las 270,000 hectáreas de maíz amarillo, por ejemplo.

El Programa de Maíz de la Universidad Agraria de La Molina viene trabajando desde hace 20 años en el mejoramiento de la especie morada habiendo logrado dos variedades -una para siembra en costa y sierra alta; y la segunda para alturas de 2,600 a 3,000 m.s.n.m- en las que se ha aumentado el tinte y mejorado la productividad lo que nos pone en inmejorables condiciones para potenciar el recurso.

La información sobre el hallazgo de Nagoya la dio el diario japonés Mainichi Shimbun. En pruebas de laboratorio con ratas se les dio comida mezclada con una sustancia cancerígena

natural que se encuentra en las partes quemadas de la carne y el pescado asado, junto con un 5% de pigmento de maíz morado.

El resultado fue que de las 20 ratas a las que se les dio sólo la sustancia cancerígena, 17 (el 85%) desarrollaron cáncer de intestino grueso frente a sólo 8 ratas (40%) de las que tomaron el pigmento.

Según la Agencia de Investigación en Cáncer de Japón, la capacidad de las sustancias cancerígenas contenidas en las zonas quemadas de los alimentos sería suficiente para causar cáncer en las personas.



Nobuyuki Ito de la Universidad de Nagoya. Japón ha decidido usar sólo colorantes naturales en la alimentación, de allí el interés en el maíz morado. Al lado, En Lima, dio a conocer los detalles de la investigación.

San-Ei Gen, empresa de Osaka, fabricante de aditivos para alimentos que ha participado en la investigación ha declarado que en Japón y otros países desarrollados los cánceres de intestino grueso van en aumento. De allí que desean continuar con los estudios del pigmento del maíz morado y su uso en alimentos medicinales.