

Universidad Nacional de Ingeniería
Facultad de Ingeniería Química y Textil

TESIS PARA OPTAR POR EL TITULO DE
INGENIERO QUÍMICO

ESTUDIO DE SEPARACION DEL COLORANTE DEL
CAMU-CAMU

Bachiller **MARIA DEL ROSARIO PELLA LEYVA**

2004

Agradecimientos:

Al Ing. Enrique Neira y al Licenciado Jorge Breña por su asesoría, paciencia y apoyo brindado.

Al Sr. Victor Rojas y Sra. Rosa Sáenz por apoyarme desde que nos conocimos.

Al personal de los Laboratorios N° 14, 21 y amigos.

Dedicatoria:

A mis padres y mis hermanos por el apoyo y fuerza que siempre me han brindado.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación realizado en la Universidad Nacional de Ingeniería, en los laboratorios de Química Orgánica N° 14 y de Investigación y Química Aplicada N° 21, tiene por objetivo la separación y la purificación preliminar del pigmento del camu-camu para su aplicación en la industria de alimentos y en la industria cosmética y farmacéutica, en productos como caramelos, gelatinas, gaseosas y cosméticos, entre otros.

Para ello se realizó un estudio de la extracción y los factores que controlan el proceso, tales como: tipo de solvente empleado, tiempo de extracción, relación masa-solvente, número de etapas, así como su purificación empleando la precipitación con acetato de plomo y cromatografía de intercambio iónico e identificación mediante espectroscopia Ultra Violeta-visible. La caracterización se realiza mediante pruebas físicas y con el empleo de reactivos de desplazamiento.

INDICE

	DESCRIPCION	PAGINA
	INTRODUCCIÓN	1
	CAPITULO 1 ESTUDIO DE LA MATERIA PRIMA	3
1.1	Aspectos Generales del Fruto	3
1.1.1	Taxonomía	3
1.1.2	Morfología	6
1.1.3	Composición del Fruto	7
1.1.4	Epoca y Método de Cosecha	9
1.1.5	Usos del Fruto	10
1.1.6	Descripción del Proceso de industrialización del camu-camu	11
1.1.7	Presencia del camu - camu en el mercado	15
	CAPITULO 2 PIGMENTOS EN EL CAMU-CAMU	20
2.1	Flavonoides	20
2.1.1	Estructura	20
2.1.2	Aislamiento e Identificación	22
2.1.3	Determinación de Estructuras	26
2.2	Antocianinas	30
2.2.1	Estructura	37
2.2.2	Aislamiento de antocianinas	40
2.2.3	Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas	43
2.3	Análisis de Antocianinas	60
2.3.1	Introducción	60
2.3.2	Mediciones Espectrales	62
2.3.3	Procedimiento de Extracción	62
2.3.4	Determinación de Antocianinas Totales	64
2.3.5	Método de Evaluación de Antocianinas Totales	67

2.3.6	Indice de Degradación	68
2.4	Purificación de antocianinas	70
2.4.1	Precipitación con acetato de plomo	70
2.4.2	Cromatografía en columnas de poliamida	72
2.4.3	Cromatografía con resinas de intercambio iónico	72
CAPITULO 3	ESTUDIO EXPERIMENTAL DE SEPARACIÓN DEL PIGMENTO DE LA CASCARA DEL CAMU-CAMU	74
3.1	Generalidades	74
3.2	Parámetros Recomendables para la Extracción del pigmento	77
3.2.1	Influencia del Solvente empleado en la extracción	77
3.2.2	Influencia del Acido empleado en la extracción	77
3.2.3	Influencia del Tiempo de Extracción	79
3.2.4	Influencia de la relación Masa Solvente	80
3.2.5	Influencia del Número de Etapas en la Extracción	81
3.3	Purificación de antocianinas	83
3.3.1	Concentración del extracto - Influencia de la Temperatura	83
3.3.2	Precipitación con acetato de plomo	85
3.3.3	Cromatografía de intercambio iónico	87
3.4	Secado	90
3.5	Caracterización	91
3.5.1	Contenido de Maltodextrina	91
3.5.2	Contenido de Humedad	91
3.5.3	Determinación de Plomo Residual	91
3.5.4	Desplazamientos batocrómicos e hipsocrómicos por el uso de reactivos de diagnóstico	91
3.6	Aplicaciones	93
CAPITULO 4	CALCULOS DE PROCESO	96
4.1	Balance de Masa	96

4.1.1	Extracción	96
4.1.2	Precipitación	97
4.1.3	Regeneración	97
4.1.4	Secado	98
4.1.5	Recuperación del alcohol etílico	98
4.2	Balance de Energía	99
CAPITULO 5	CONCLUSIONES Y OBSERVACIONES	101
CAPITULO 6	BIBLIOGRAFÍA	103
Apéndice N° 01	Purificación preliminar de antocianinas (espectros)	106
Apéndice N° 02	Propiedades de las antocianinas	112
Apéndice N° 03	Equipos, Materiales y Reactivos Empleados	118
Apéndice N° 04	Análisis espectral UV para flavonoides usando reactivos de desplazamiento	120

INTRODUCCIÓN

La región amazónica es un importante centro de frutales nativos únicos en sabor y aroma. Algunos de ellos actualmente tienen importancia mundial y se cultivan en casi todas las zonas tropicales del mundo, como la papaya, la anona, el copuassú, la piña y el maracuyá. Sin embargo, la mayor parte de estos frutales son conocidos y consumidos en el ámbito local y otros son prácticamente desconocidos fuera de la región.

El camu-camu es uno de los frutales amazónicos que está mereciendo cada vez mayor atención por sus características peculiares y su reciente introducción en los mercados mundiales, especialmente en Japón. La causa es su elevado contenido de vitamina C, que llega a 2,700 mg por 100 g de pulpa, que equivale a casi 40 veces el de la pulpa de naranja. Sin embargo, es conveniente tener presente que el interés por el camu-camu, como fuente de vitamina C existe desde hace más de tres décadas; lo que no existía era el conocimiento para cultivarlo, técnica y sosteniblemente, fuera de su ambiente natural, las llanuras inundables de los ríos Ucayali y Amazonas y sus afluentes.

En el Perú, durante los últimos 15 años, se ha realizado un gran esfuerzo de investigación de la especie, lo que ha permitido la adaptación de su cultivo, de las zonas inundables a las zonas no inundables, con excelentes resultados.

El establecimiento de plantaciones de camu-camu, utilizando la tecnología disponible, permitirá disminuir la presión que se creará sobre las poblaciones nativas, cuando aumente la demanda por la fruta. Las plantaciones pueden ser efectuadas tanto en zonas aluviales inundables que hayan sido deforestadas, como en zonas con drenaje deficiente. En el primer caso, las plantaciones también tendrán un efecto reforestador y protegerán las riberas de los ríos y las tierras adyacentes de las inundaciones, además de constituir una fuente de ingreso

económico para los agricultores. En el segundo caso, el cultivo del camu-camu constituye una de las pocas opciones técnicas y rentables para estos suelos. (Villachica, 1996)

CAPITULO 1 ESTUDIO DE LA MATERIA PRIMA

1.1 Aspectos Generales del Fruto

1.1.1 Taxonomía

El camu-camu pertenece a la familia botánica *Myrtaceae*, género *Myrciaria*. A pesar que este género no es muy amplio, poco se ha estudiado de la taxonomía del camu-camu.

Existen dos tipos de camu-camu: el arbustivo y el arbóreo y, aparentemente, no son de la misma especie. Las principales diferencias entre éstas dos especies de camu-camu se presentan en el Cuadro N° 1.1:

El camu-camu arbustivo fue identificado por Mc Vaugh (1958) inicialmente como *Myrciaria paraensis* Berg, pero el mismo Mc Vaugh (1963) posteriormente revisó y cambió la nomenclatura a *Myrciaria dubia* H.B.K, y el arbóreo, que aún no ha sido investigado ni clasificado taxonómicamente, es posible que se trate de *Myrciaria floribunda* (Villachica et al., 1996.)

El camu-camu arbustivo crece en las orillas (llanura de inundación) de los ríos, riachuelos, cochas y lagunas, permaneciendo cubierto por agua hasta cinco meses. El camu-camu tipo arbóreo generalmente se encuentra en los pantanos de aguas negras y zonas con mal drenaje, que se ubican en la segunda posición fisiográfica sobre el río (terrazas inundables y no inundables), y la parte inferior de su tallo queda sumergida solamente en las crecientes de mayor intensidad (Villachica, 1996).

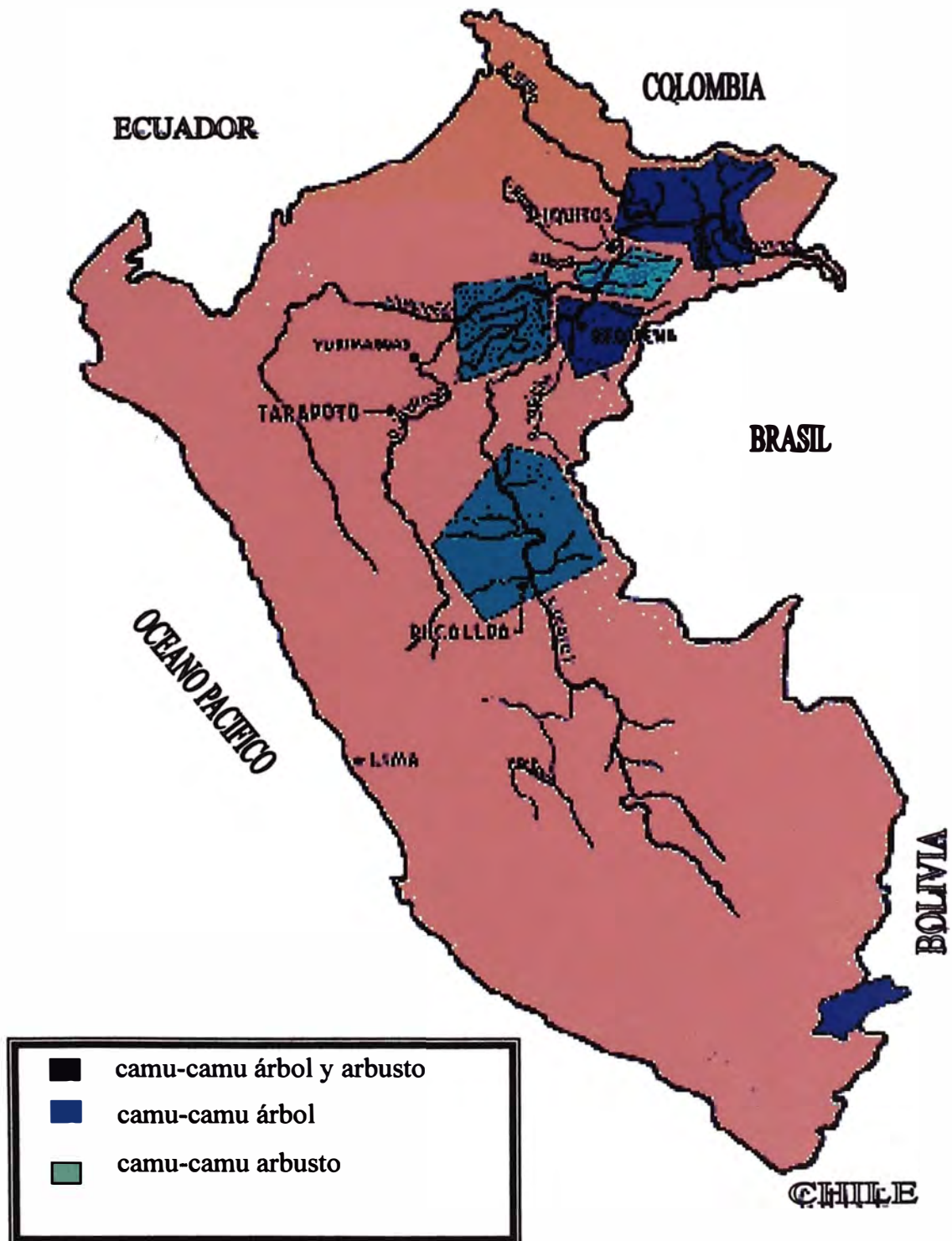
Cuadro N° 1.1 Diferencias entre las dos especies de camu - camu

Característica	Myrciaria dubia	Myrciaria sp.
Porte de planta:	Arbusto	Árbol
Época de cosecha:	diciembre-marzo	marzo-mayo
Peso de fruto:	10 g hasta 20 g	23 g hasta 40 g
Color de fruto:	rojo intenso a morado	Morado a marrón
Cáscara del fruto:	Apergaminada	Semi leñosa
Color de semilla:	Amarillenta	Rosada
Tamaño de semilla:	generalmente grande	pequeña y pilosa
Forma de semilla:	chata, reniforme	ovalada, dura
Semillas por fruto:	1 a 4	1 a 2
Fruto:	Menor tamaño	Mayor tamaño
Contenido ácido ascórbico:	Mayor	Menor

Fuente: Villachica (1996)

Su distribución natural indica que la mayor concentración de poblaciones y de diversidad se encuentra en la Amazonía peruana, a lo largo de los ríos Ucayali y Amazonas y sus afluentes, en el sector ubicado entre las localidades de Pucallpa (sobre el río Ucayali) y Pebas (sobre el río Amazonas). Estudios realizados indican que las zonas donde se observa la mayor concentración de poblaciones son la quebrada del Supay, tributario del Bajo Ucayali, y el río Nanay, tributario del Alto Amazonas. La Figura N° 1.1, presenta la distribución de las poblaciones naturales muestreadas por Mendoza et al. (1989).

Figura N° 1.1 Distribución de las poblaciones naturales de camu-camu en la Amazonía Peruana.



Chávez (1993), indica que el camu-camu se encuentra a lo largo del río Amazonas hasta el estado de Amazonas en Brasil, así como en la cuenca superior del río Orinoco, y en el estado de Rondonia, Brasil. Sin embargo, la presencia de la especie en estas zonas no es tan frecuente y abundante como la observada a lo largo de los ríos y lagos en la Amazonía peruana, donde se encuentran grandes poblaciones nativas (Chávez, 1993; Peters y Vásquez, 1986).

1.1.2 Morfología

El camu-camu es un arbusto que alcanza hasta 4 m de altura; se ramifica desde la base formando varios tallos secundarios que a su vez ramifican en forma de vaso abierto. Las raíces son profundas y con muchos pelos absorbentes.

El fruto es globoso de superficie lisa y brillante, de color rojo oscuro, tal como se muestra en la Figura N° 1.2, hasta negro púrpura al madurar; puede tener 2 a 4 cm de diámetro; con una a cuatro semillas por fruto. Las semillas son reniformes (forma de riñón) y aplanadas con 8 a 11 mm de longitud y 5.5 a 11 mm de ancho, cubiertas por una vellosidad blanca rala de menos de 1 mm de longitud.

Figura N° 1.2 Camu-camu



La floración generalmente empieza cuando la planta alcanza un diámetro basal de 2.0 cm, y no está sincronizada en cada planta, ya que ocurre en varios ciclos durante el año. En las poblaciones naturales que se encuentran en las áreas inundables a lo largo de los cauces de agua, la floración natural se produce cuando los ríos han disminuido su caudal, dejando los tallos y hojas expuestos a la luz. Esto normalmente se presenta entre los meses de setiembre y octubre. La fructificación se presenta entre diciembre y febrero, dependiendo de la localidad.

En plantaciones efectuadas en zonas con buen drenaje, lejos de la influencia de las inundaciones, la floración presenta dos picos en el año. El primero se da entre los meses de setiembre y octubre y el segundo entre los meses de marzo y abril, con la fructificación produciéndose tres a cuatro meses más tarde (Villachica, 1996).

1.1.3 Composición del Fruto

La composición químico-nutricional de 100 g de pulpa de camu-camu se presenta en el Cuadro N° 1.3. El mayor componente es el ácido ascórbico, tal como se observa en el cuadro mencionado. El contenido de proteínas y carbohidratos es también importante, mientras que los demás constituyentes se encuentran en cantidades similares a los que se observan en otras frutas tropicales (Villachica, 1996).

Cuadro N° 1.3 Composición de pulpa de camu-camu por cada 100 g

Componente	Unidad	Valor
Agua	g	94.4
Valor energético	cal	17.0
Proteínas	g	0.5
Carbohidratos	g	4.7
Fibra	g	0.6
Ceniza	g	0.2
Calcio	mg	27.0
Fósforo	mg	17.0
Hierro	mg	0.5
Tiamina	mg	0.01
Riboflavina	mg	0.04
Niacina	mg	0.062
Acido Ascórbico Reducido	mg	2 780
Acido Ascórbico Total	mg	2 994

Fuente: Roca, 1965

Chávez (1993), manifiesta que en la cáscara del camu-camu se encuentra hasta 5 g de ácido ascórbico por 100 g de la misma. No se encontró información referente a la cantidad de pigmento contenido en la cáscara de camu-camu, ni tampoco de las propiedades físicas de la misma.

Calzada (1980), indica que el fruto pesa entre 6.3 y 8.8 g, con un peso de cada semilla que varía entre 0.6 y 0.9 g y el número de semillas entre uno y cuatro por fruto. El Cuadro N° 1.4 presenta las características de varias muestras de frutos de camu-camu provenientes de la zona de Iquitos. El tipo de fruto que predomina es el que tiene dos semillas, con un peso promedio de 6.9 g/fruto. El peso promedio de los frutos de todas las muestras fue de 8.35 g. El peso de las semillas varía entre 0.7 y 2.8 g/semilla, dependiendo del número de semillas por fruto. El peso

de la pulpa y la cáscara representa entre 69 y 79% del peso del fruto, siendo la proporción mayor en los frutos con dos semillas, correspondiendo con el menor peso de semilla.

Cuadro N° 1.4 Algunas características del fruto de camu-camu

Característica	Número de semillas por fruto			
	Una	Dos	Tres	Cuatro
Número de frutos (%)	28	53	16	3
Peso del fruto (g)	9.2	6.9	10.9	11.7
Peso de semillas/fruto (g)	2.8	1.4	3.4	3.3
Peso de una semilla fresca (g)	2.8	0.7	1.1	0.8
Peso de pulpa más cáscara por fruto (g)	6.4	5.5	7.5	8.3

Fuente: Villachica (1996)

1.1.4 Época y Método de Cosecha

La época de cosecha en plantaciones naturales ubicadas a orillas de los ríos se efectúa entre los meses de diciembre y marzo. Debido a que en estos meses el río aumenta su nivel, la cosecha es efectuada por los pobladores nativos en canoas.

En suelos aluviales que se inundan durante los meses de febrero y marzo, la cosecha se realiza entre los meses de octubre y mayo, con la mayor producción entre febrero y abril. En cambio, en los terrenos bien drenados ubicados en las partes altas y lejos de las inundaciones del río, la cosecha se realiza entre noviembre y julio del año siguiente.

En zonas que no están inundadas la cosecha es manual, sin necesidad de canoas. Los frutos se recogen dos veces por semana en la época de mayor producción y una vez cada semana en la época de menor producción y son colectados cuando empiezan a madurar, es decir cuando están al estado verde-sazón, se reconocen

porque la piel o cáscara que es de color verde adquiere algunas pintas color granate. Tres a cuatro días después de colectados, los frutos toman un color granate intenso (Villachica, 1996).

Para la elaboración del presente trabajo de investigación, se empleó camu-camu con pintas de color granate y con una coloración granate intenso.

1.1.5 Usos del Fruto

La pulpa del camu-camu puede ser empleada para la fabricación de jugos, helados, concentrados, néctares, mermeladas y para la obtención de ácido ascórbico natural.

El jugo y los helados de camu-camu son producidos y consumidos de manera tradicional en las poblaciones donde se encuentra esta fruta. Debido a su alto contenido de ácido ascórbico, la pulpa tiene que ser diluida previamente a su consumo.

Los concentrados no son preparados todavía, debido a la ausencia de materia prima, que no ha permitido desarrollar extensivamente la tecnología. Sin embargo, algunas empresas privadas están efectuando ensayos para producir concentrados tipo pasta diluida, en los cuales se mantiene al máximo la vitamina C natural que posee el camu-camu. Probablemente uno de los principales usos que se daría a la pulpa de camu-camu sería en la producción de refrescos naturales, los cuales serían distribuidos por la industria de bebidas. Normalmente la industria de bebidas absorbe el mayor porcentaje de las importaciones de las frutas tropicales.

Los néctares y mermeladas son otra manera como la pulpa de la fruta es utilizada. Estas formas de utilización son limitadas. En el caso de las mermeladas, la pulpa de camu-camu debe ser diluida con pulpa de otra fruta, por su alto contenido de acidez.

Recientemente se ha reiniciado la producción de tabletas de ácido ascórbico natural en base a la extracción de este producto del camu-camu. Se producen tabletas de polvo deshidratado de camu-camu, que contienen 50% de vitamina C, a las cuales se les agrega algún otro producto natural para hacerlo más atractivo, como por ejemplo el propolio producido por las abejas. Esta es otra forma en la cual posiblemente se utilicen altas cantidades de pulpa de fruta de camu-camu.

1.1.6 Descripción del Proceso de industrialización del camu-camu

Dos procesos serían los principales para la utilización del camu-camu. El primero se refiere a la producción de pulpa refinada para su uso en néctares y bebidas, mientras que el segundo sería el relacionado a la producción de cápsulas.

El proceso experimental para la producción de pulpa refinada de camu-camu comprende las siguientes etapas: cosecha, transporte, recepción en planta, lavado y selección, pulpeado y refinado, estabilizado de la pulpa, envasado y almacenado. La Figura N° 1.3 presenta el Flujo de Proceso, cuyas etapas, hasta el pulpeado se describen a continuación:

Cosecha de la fruta

La fruta más conveniente para la obtención de pulpa refinada de camu-camu es la que está en estado semimaduro, que llega a madurar en el período que transcurre entre la cosecha y la industrialización. Esta fruta es preferida porque se obtendrá néctar de color rosado, proveniente de los pigmentos que se encuentran en la cáscara: pigmentos rojo-morado en la fruta madura y verde en la fruta verde.

Transporte

La fruta cosechada debe acomodarse en recipientes de hasta 10 Kg de capacidad. Se deberá colocar la fruta más verde (de mayor consistencia) en el fondo del

recipiente y la más madura encima. No se utilizará envases muy grandes, para evitar que la fruta se aplaste. La fruta debe transportarse en condiciones frescas, sin exponerse al sol, para disminuir el riesgo de fermentación de la fruta madura.

Recepción y primer lavado

La fruta es recepcionada en la planta industrial, pesada y luego lavada. Este primer lavado tiene por objetivo eliminar la tierra, polvo, hojas y ramillas que estén presentes en cada embalaje y en la fruta. La fruta puede ser almacenada hasta tres días, si el período transcurrido desde la cosecha es menor de 24 horas. La fruta debe ser almacenada a la sombra y en zonas con flujo de aire para favorecer la evaporación del agua de lavado.

Remojar

La fruta lavada se remoja en una solución de agua potable conteniendo un desinfectante. Puede utilizarse metabisulfito de sodio al 0.5% por diez minutos, o algún desinfectante natural biodegradable.

Segundo lavado

Se efectúa con agua potable y tiene por objetivo eliminar los residuos de fungicida en ella. Este lavado puede hacerse con chorros a presión.

Selección

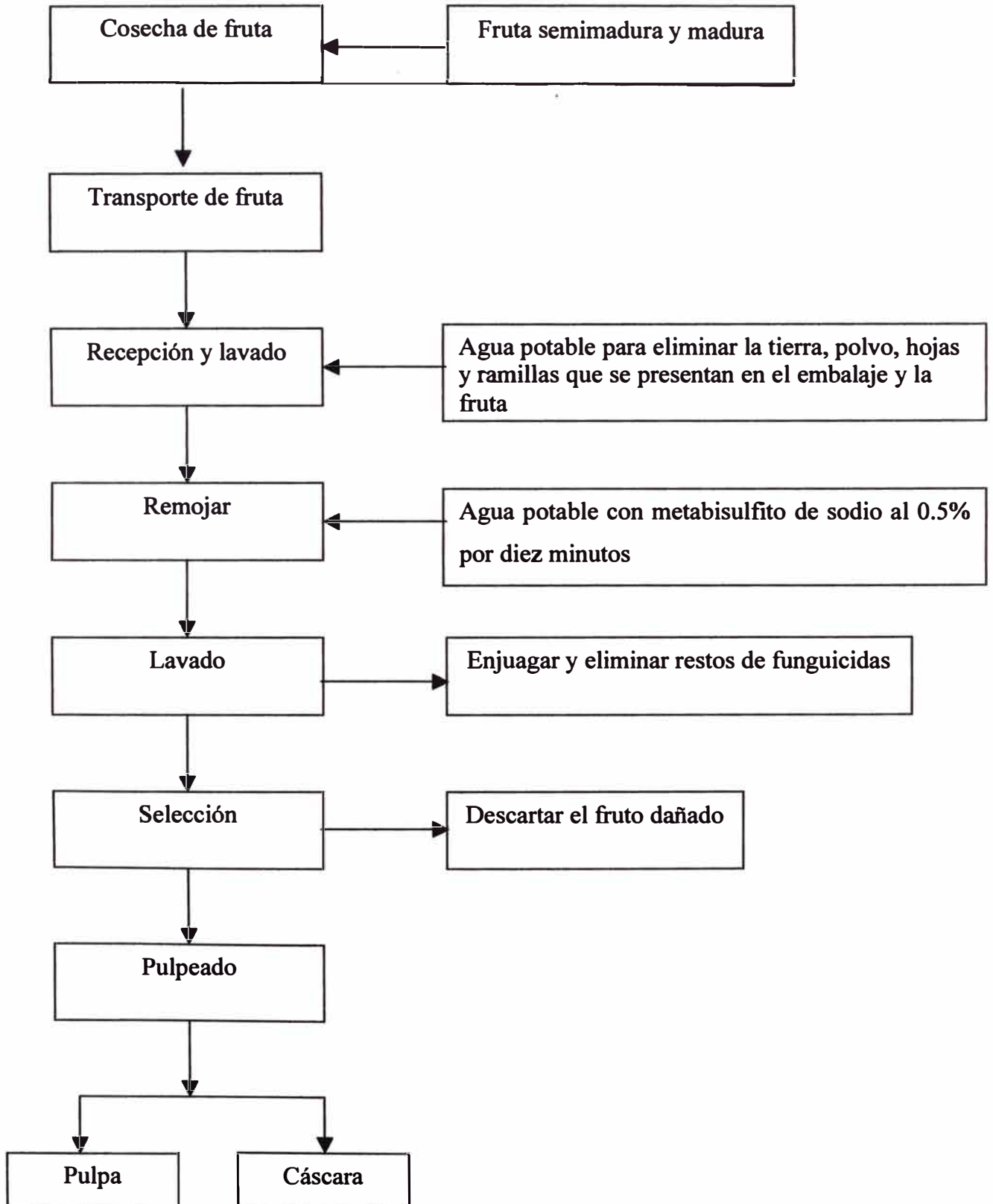
La fruta lavada es pasada por una faja transportadora en la cual se eliminan las malogradas y las que no reúnen las características deseadas. En esta etapa también se puede clasificar las frutas, de requerirlo el proceso.

Pulpeado

La fruta seleccionada de acuerdo a las características especificadas para el producto es pasada a una pulpeadora. La pulpeadora normalmente trabaja a baja velocidad y tiene una malla de alrededor de 5 mm. La pulpa se colecta en un recipiente, mientras que las semillas y cáscaras se colectan aparte.

Las cáscaras recolectadas en esta etapa, son empleadas como base para el presente trabajo de investigación.

Figura N° 1.3 Diagrama de Flujo del proceso para obtener pulpa refinada de camu-camu.



1.1.7 Presencia del camu - camu en el mercado

(Datos tomados del Programa de Agroexportación del camu-camu- Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana)

a. Mercado nacional

Oferta:

En la actualidad existen aproximadamente 300 hectáreas de poblaciones naturales de camu-camu, dichas áreas tienen una producción estimada de 14,000 Kg por hectárea; es decir que tendríamos un volumen anual de 4,200 Tm de fruta, distribuida en cuatro meses (diciembre –marzo) a ritmo de 1,300 Tm por mes.

Demanda:

Esta se concentraba en los principales centro poblados ubicados en las Cuencas de los ríos Ucayali, Marañón, Huallaga, Amazonas y Napo, quienes absorben toda la producción de las poblaciones naturales, la que es consumida en refrescos y helados. Estudios desarrollados por el INIA en 1987, indican que Iquitos consumía un promedio de 31 Tm/año y Pucallpa aproximadamente 15 Tm.

En los últimos años se viene observando una ligera demanda de mercados costeros, principalmente limeños, para consumo de refrescos, helados, y para pruebas de gaseosas, pulpa congelada y producto liofilizado.

Entre 1995 y 1997, en la ciudad de Iquitos y Pucallpa se generó la demanda de la fruta por empresarios que procesan para obtener pulpa, congelarla y exportarla directamente a mercados japoneses. Se estima que

esta demanda absorbe 150 Tm de la producción de las poblaciones naturales.

b. Mercado Internacional

Oferta:

En los dos últimos años la oferta exportable proviene de dos empresas, una localizada en Pucallpa y otra en Iquitos, quienes produjeron un total de 70 Tm de pulpa congelada, producto que procedería de un total de 150 Tm de fruta.

Demanda:

Esta procede principalmente de Japón, pero como pulpa congelada para utilizarlas en mezclas con otros frutos exóticos.

Como ya se ha mencionado, el presente trabajo plantea el estudio de separación del colorante (del tipo antocianina) de la cáscara de camu-camu, es por ello que cabe resaltar los niveles y mercados actuales de exportación de antocianinas del maíz morado. Ver Cuadro N° 1.5, Figuras N° 1.4,1.5

**Cuadro N° 1.5 Exportaciones de antocianina de maíz morado del Perú
Enero de 2000 - Marzo del 2003**

Partida Arancelaria: 3203001930 / 3203001600

MERCADO	2000		2001		2002	
	FOB (US\$)	PESO NETO (KG)	FOB (US\$)	PESO NETO (KG)	FOB (US\$)	PESO NETO (KG)
ALEMANIA	149 750.92	2 625.00	147 075.92	2 500.00	96 200.00	1 300.00
ESPAÑA	0.00	0.00	8 580.00	6 240.00	0.00	0.00
JAPON	0.00	0.00	3 850.00	201.00	1 800.00	100.00
COREA DEL SUR	2 100.00	25.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ESTADOS UNIDOS	29 234.50	365.00	0.00	0.00	0.00	0.00
TOTAL	181 085.42	3 015.00	159 505.92	8 941.00	98 000.00	1 400.00

FUENTE: ADUANAS

ELABORACION: PROMPEX

**Figura N° 1.4 Exportación de antocianinas de maíz morado
enero 2000 - marzo 2003**

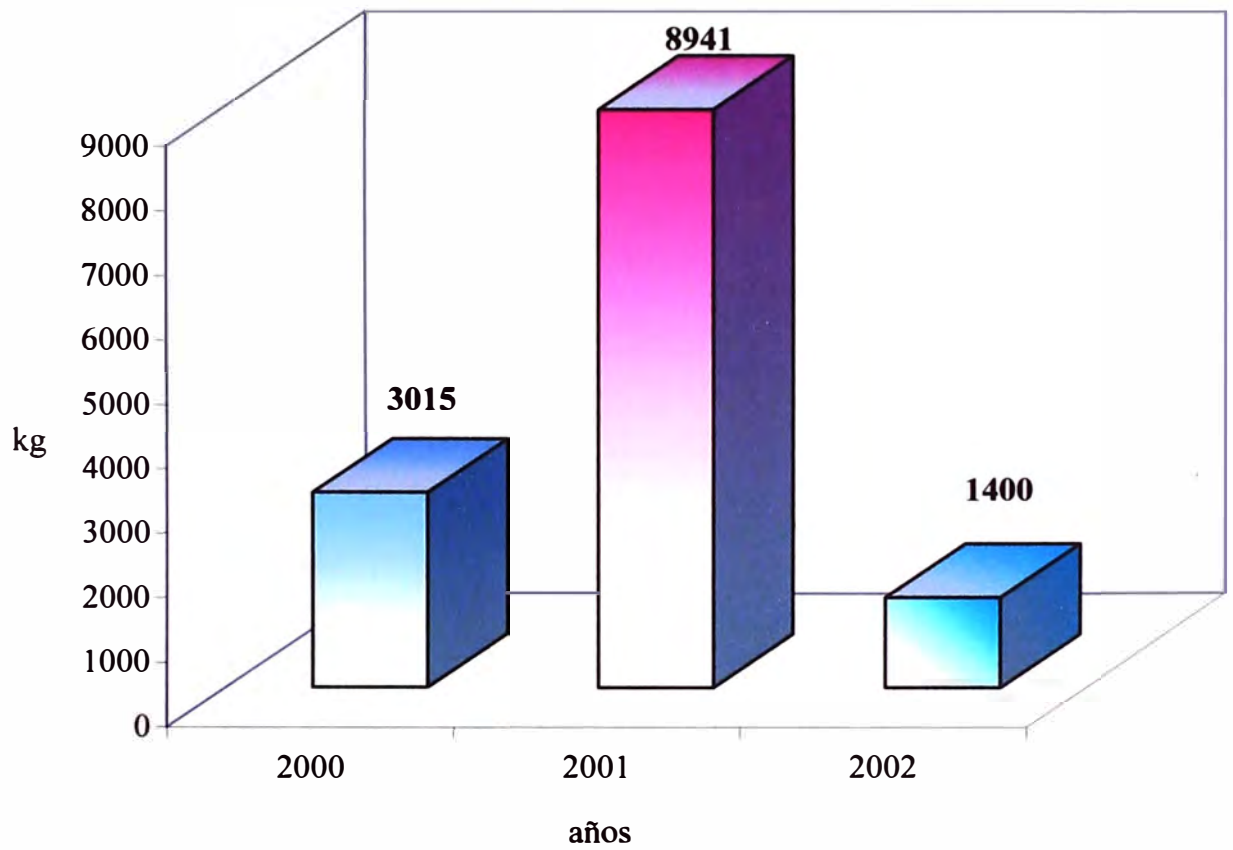
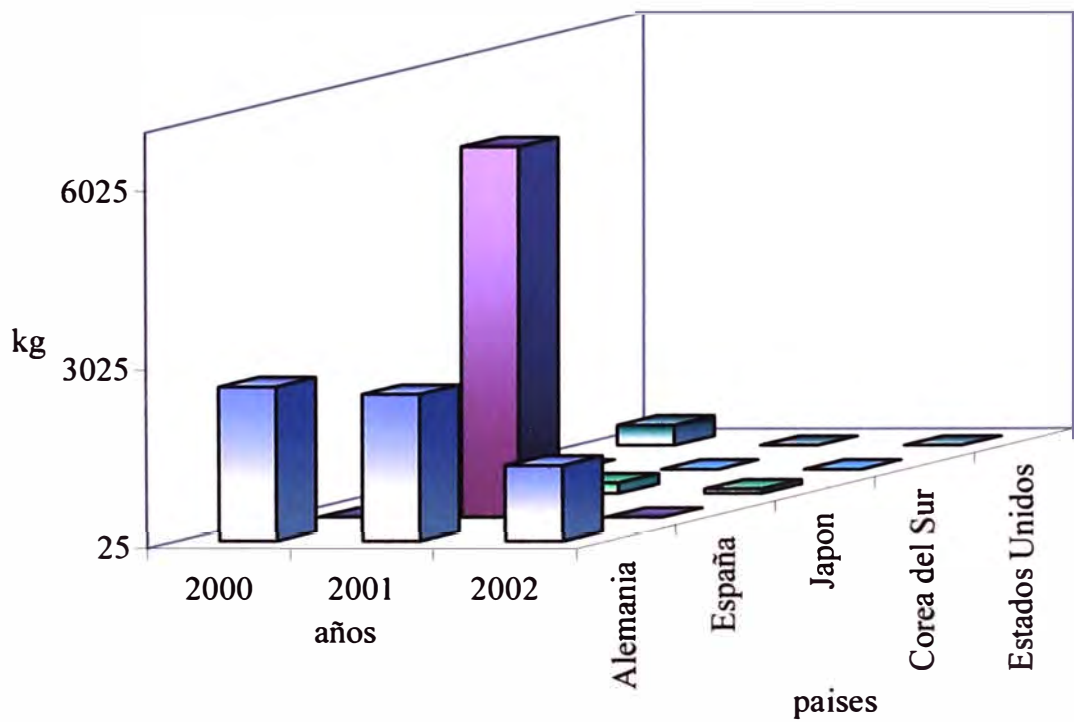


Figura N° 1.5 Mercados destinos de las exportaciones de antocianinas del maíz morado



■ Alemania ■ España ■ Japon ■ Corea del Sur ■ Estados Unidos

CAPITULO 2 PIGMENTOS EN EL CAMU-CAMU

2.1 Flavonoides

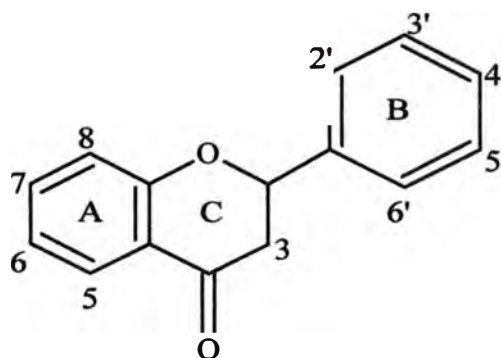
Los pigmentos flavonoides son uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos en la naturaleza, son solubles en agua y etanol, presentan intensidad de máxima de absorción en la región ultravioleta y visible del espectro, debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados.

Los flavonoides se emplearon durante mucho tiempo como colorantes de lana, y actualmente se usan en la conservación de las grasas o jugos de frutas debido a las propiedades antioxidantes de algunas polihidroxi flavonas. Entre otras aplicaciones, cabe mencionar la de los glucósidos de dihidrochalconas (edulcorantes) y la rotenona (insecticida) (Lock de Ugaz, 1997).

2.1.1 Estructura

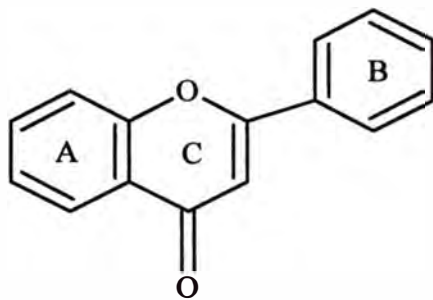
Se conocen como diez clases de flavonoides, todos contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico (Figura N° 2.1) y están arreglados bajo un sistema $C_6-C_3-C_6$, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C.

Figura N° 2.1 Núcleo básico de un flavonoide

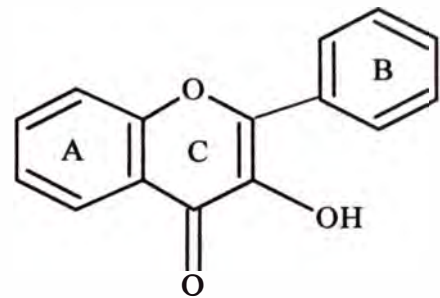


La Figura N° 2.2, detalla ejemplos típicos de flavonoides. Las antocianinas pertenecen también a esta clase de compuestos (Lock de Ugaz, 1997).

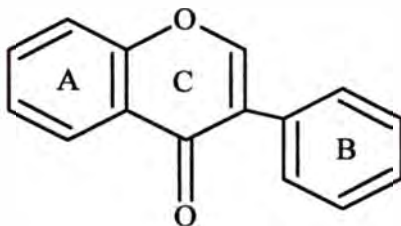
Figura N° 2.2 Ejemplos de Flavonoides



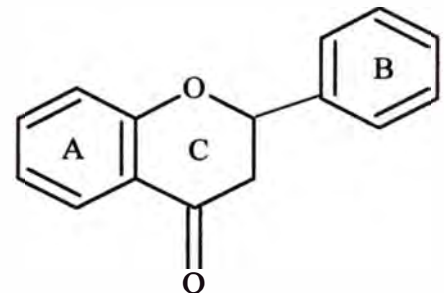
Flavonas



Flavonoles



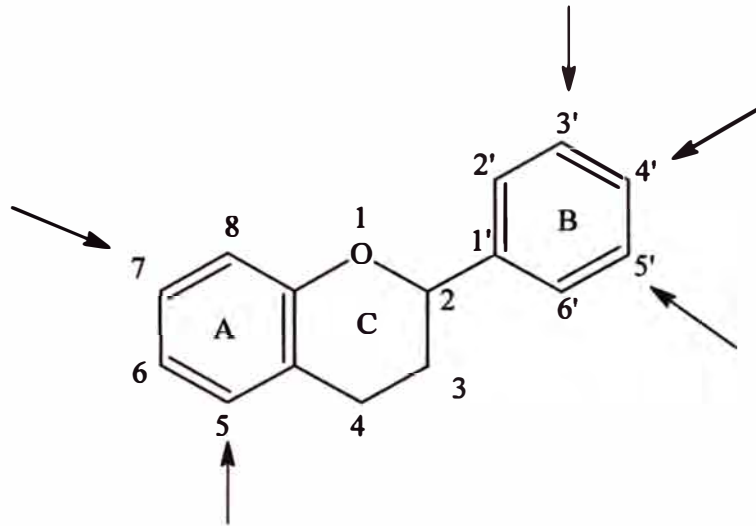
Isoflavonas



Flavanonas

La estructura base puede presentar hidroxilos o metoxilos. En general, el anillo A presenta hidroxilos y no metoxilos, los cuales se ubican mayormente en posición 5 y 7. El anillo B, en cambio, presenta 1, 2 ó 3 hidroxilos o metoxilos, los cuales se ubican de la siguiente manera: si hay un solo sustituyente (rara vez un metoxilo) se ubica en la posición -para- del punto de unión con el resto de la molécula, es decir en posición 4', un segundo y tercer sustituyente se ubican en posición orto con éste, es decir 3' y 5', como se muestra en la Figura N° 2.3 (Goodwin, 1976).

Figura N° 2.3 Sitios de hidroxilación y metoxilación



2.1.2 Aislamiento e Identificación

Los flavonoides se encuentran generalmente glicosidados, y por lo tanto son altamente polares; en las plantas se ubican preferentemente en las vacuolas y son hidrofílicos. Por ello hay que extraerlos y solubilizarlos en solventes polares como agua y etanol. Las agliconas, en cambio, son solubles en éter de petróleo y diclorometano pero no en agua.

Conviene usar la muestra previamente secada, así las enzimas no tienen actividad, evitando la degradación de los compuestos. Asimismo, conviene usar etanol y no agua, porque el etanol inactiva las enzimas (rompe la estructura terciaria) y es de fácil eliminación.

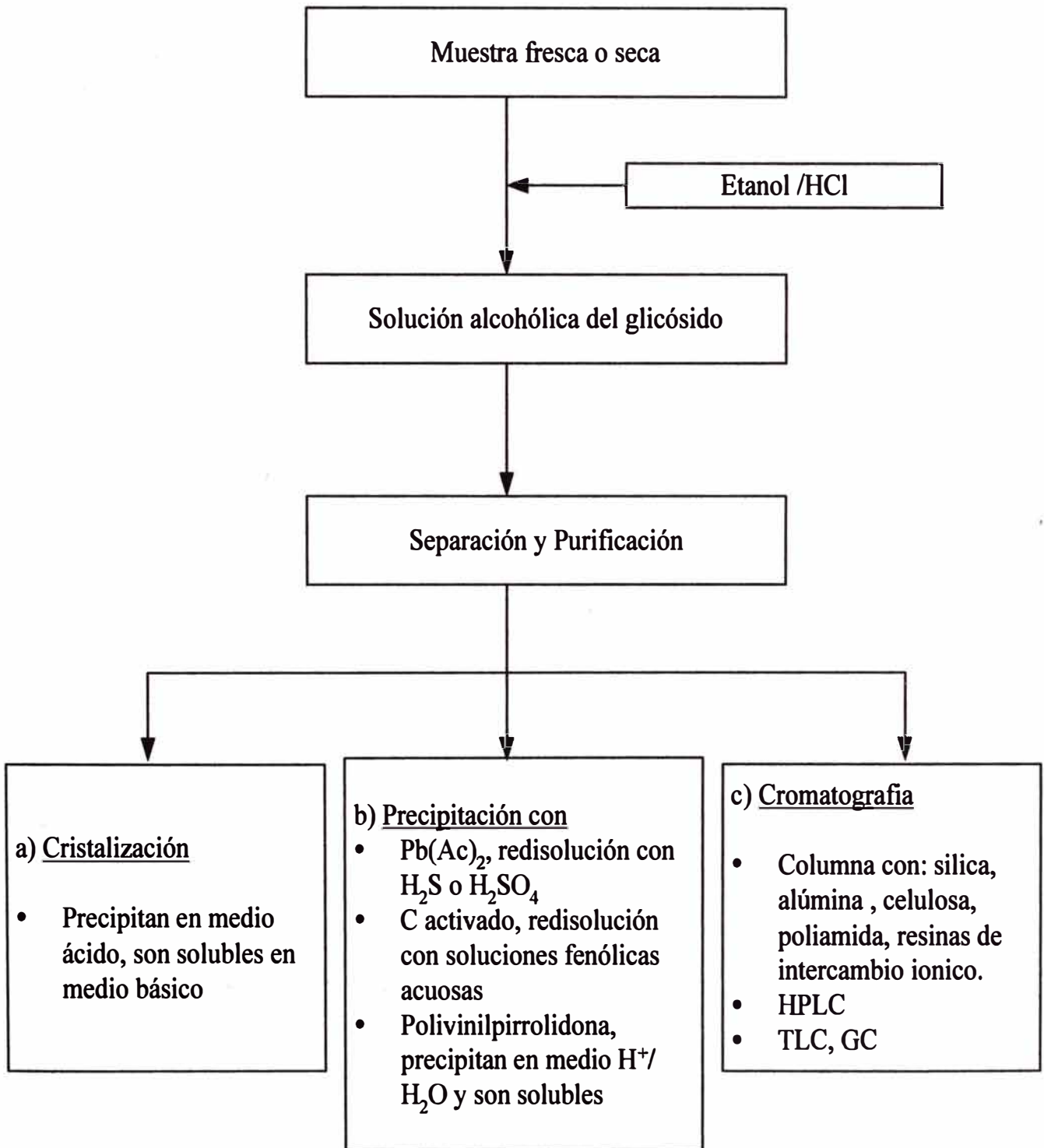
Para aislar los flavonoides del extracto etanólico, se tienen tres posibilidades (Figura N° 2.4) que pueden usarse por combinación:

- a) **Cristalización en medio ácido, redisolviéndolos luego en medio básico.**
- b) **Precipitación con acetato de plomo (precipitan los di- y polihidroxifenoles de los monohidroxilados, que quedan en solución) y posterior tratamiento del precipitado con ácidos sulfhídrico o sulfúrico, para recuperar los flavonoides precipitados como sulfuro o sulfato de plomo, conveniendo usar sulfatos y no sulfuros, ya que el sulfuro de plomo tiene un gran poder de adsorción y eso no es recomendable, para finalmente precipitar los compuestos fenólicos hidroxilados a pH ácido en metanol, utilizando polivinilpirrolidona PVP o carbón activado absorbiendo compuestos intermediarios, filtrado y liberando los flavonoides del fenol por competencia.**
- c) **Cromatografía mediante columnas de resina de intercambio iónico ácidas (fase H^+), que separan los flavonoides del material soluble. El fraccionamiento se puede lograr por cromatografía de adsorción usando como fase estacionaria sílica gel, celulosa, poliamida, alúmina y Sephadex (polímeros de dextranos, forman poros y separan por tamaño). Jugando con la polaridad de los solventes se puede lograr muy buenas separaciones. Primero con un solvente apolar se elúen las agliconas que están bastante metoxiladas, luego aumentando la polaridad de la fase móvil se puede eluir compuestos polihidroxilados y finalmente con solventes muy polares se elúen los glicósidos. El inconveniente se presenta porque quedan retenidas otras sustancias.**

A nivel de análisis químico, las técnicas cromatográficas nuevas, como HPLC (High Performance Liquid Chromatography o Cromatografía Líquida de Alta Precisión) y DCCC (Droplet Counter Current Chromatography o Cromatografía Contracorriente a la Gota), necesitan una columna de fase reversa ODS C-18 (OctaDodecilSilano) y solventes polares tales como mezclas de agua metanol y/o acetonitrilo.

Además, la técnica GC (Gas Chromatography o Cromatógrafo de Gases) requiere de compuestos termoestables y agentes acilantes a fin de aumentar la volatilidad, siendo únicamente con fines analíticos. Se puede acoplar la cromatografía de gases a la espectrometría de masas. La fragmentación principal implica la ruptura del anillo (Mabry, 1963).

Figura N° 2.4 Esquema de separación de flavonoides



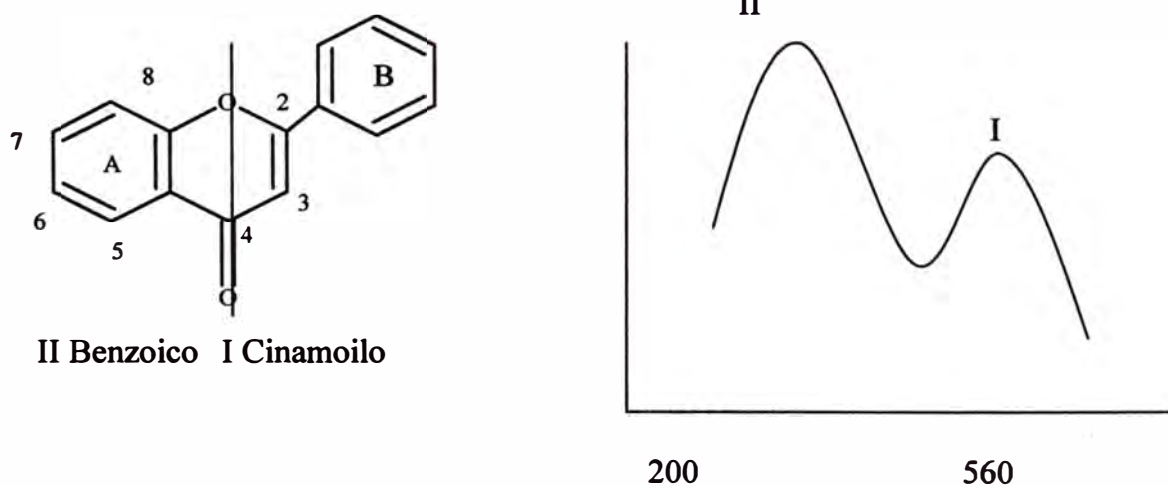
2.1.3 Determinación de Estructuras

Si se tiene un glicósido se debe identificar la aglicona y también los azúcares. Para ello se hidroliza el glicósido, pudiendo previamente metilar los hidroxilos libres. Los azúcares son identificados por TLC (Cromatografía de Capa Fina) y por RMN (Resonancia Magnética Nuclear), y la aglicona se identifica por RMN y por espectrofotometría UV-VIS (Mabry, 1983).

Espectrofotometría UV

Es usado ampliamente por requerir solo pequeñas cantidades del compuesto puro, el cual no se destruye. El espectro UV de un flavonoide se relaciona con su estructura de la siguiente manera:

Figura 2.5 Representación General del Espectro de Absorción de los Flavonoides



Cuadro N° 2.1 Valores de absorción para las banda I (BI) y banda II (BII) de los diferentes tipos de flavonoides

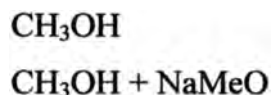
En general:

Banda II	240-285 nm
Banda I	300-550 nm

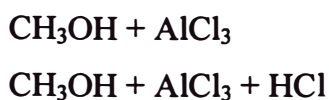
	Banda II (nm)	Banda I (nm)
Flavonas	250-280	310-350
Flavonoles (3-OH sustituido)	250-280	330-360
Flavonoles (3-OH libre)	250-280	350-385
Isoflavona	245-275, intensa	310-330, hombro
Isoflavonas, dihidroflavonoles	275-295, intensa	300-330, hombro
Chalconas	230-270, baja intensidad	340-390, intensa
Auronas	230-270, baja intensidad	380-430, intensa
Antocianidinas, antocianinas	270-280	465-560, intensa

Fuente: Lock de Ugaz, (1997)

El espectro en metanol de los flavonoides da información sobre el tipo de flavonoide y el estado de oxidación. Los máximos de absorción de los flavonoides varían de acuerdo al estado de oxidación del anillo central y según el número y posición de los grupos OR, como resultado de los diferentes sistemas conjugados que se pueden generar. El empleo de reactivos de desplazamientos como metóxido de sodio, cloruro férrico, acetato de sodio y ácido bórico producen corrimientos de los máximos de absorción de acuerdo a la localización y naturaleza de las funciones oxigenadas.

Primer Reactivo de Desplazamiento

Se tiene un espectro del flavonoide en metanol entre 200 a 560 nm. Luego se agrega, en la misma cubeta metóxido de sodio y se obtiene un nuevo espectro. El metóxido de sodio es una base fuerte y arranca todos los protones de los hidroxilos libres causando un desplazamiento batocrómico (a longitudes de onda mayores) en ambas bandas. Este es mayor en la 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 grupo sensibles a álcalis.

Segundo Reactivo de Desplazamiento

Se obtiene en primer lugar el espectro en metanol, luego en metanol más tricloruro de aluminio y finalmente en metanol con tricloruro de aluminio con ácido clorhídrico. El desplazamiento 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 o en C3. El quelato con los hidroxilos en orto en el anillo B no es estable en medio ácido.

Si los espectros realizados en $\text{CH}_3\text{OH} + \text{AlCl}_3$ y en $\text{CH}_3\text{OH} + \text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ coinciden, se puede concluir que no existen grupos hidroxilos en el anillo B. Por el contrario, si el espectro de CH_3OH no cambia con la adición del $\text{CH}_3\text{OH} + \text{AlCl}_3 + \text{HCl}$, no hay hidroxilos en 3 ni en 5. Si el espectro cambia mostrando un efecto batocrómico, efectivamente tenemos un hidroxilo libre en 3 y/o en 5.

Tercer reactivo de desplazamiento

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

Al agregar ácido bórico (H_3BO_3) a la cubeta, se puede observar un efecto batocrómico de la banda I si el anillo B contiene o-dihidroxilos. Esto se debe a que el ácido bórico en presencia de acetato de sodio forma un complejo con o-dihidroxilos, es decir forma diésteres con hidroxilos en orto, en general con dihidroxilos del anillo B. Además el ácido bórico puede protonar al OH en 7 y restablecer la banda II. Como se observa en el Cuadro N° 2.2.

Cuadro N° 2.2 Variación en la absorción UV-VIS de los flavonoides (nm)

Esqueleto	CH_3OH	NaOMe	NaOAc	AlCl_3
Flavonas	315-350	40-60	---	25-40
Flavonoles	350-385	40-60	---	40-60
Flavanonas	275-295	30-40	30-40	20-30
Isoflavonas	250-270	10-15	5-15	10-20
Chalconas	370-395	40-60	---	50-65
Auronas	385-415	40-60	---	50-65
Antocianinas	475-545	Inest.	Inest.	15-50

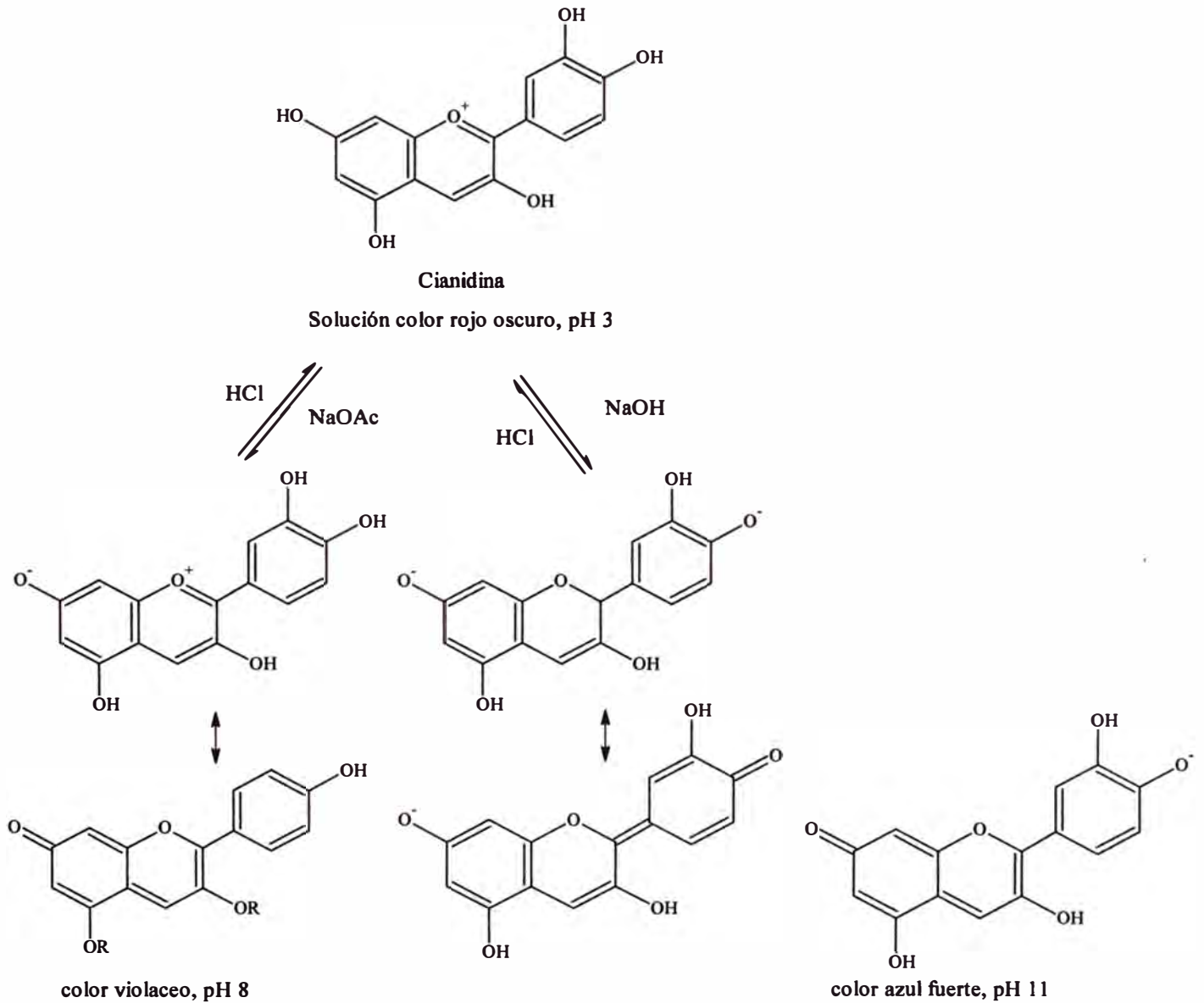
2.2 Antocianinas

El término antocianina (del griego: anthos = flor y kianos = azul) fue utilizado por Marquat (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 y escarlata, que aparecen en muchas flores, frutos, algunas hojas y raíces de plantas, se deben a esta familia de pigmentos.

Willstätter y Everest (1913) separaron la cianidina a partir de unas flores azules reconociendo que era un diglicósido y propusieron que el término antocianina se aplicara para el glicósido y de antocianidina para la aglicona. Ellos también reconocieron la naturaleza ozonio de estos compuestos por lo que utilizaron un medio ácido para su extracción, venciendo así las dificultades de su extracción en solventes neutros.

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 su procesamiento del material crudo y el almacenaje, los que se manifiestan en pérdida de color, oscurecimiento del producto y formación de precipitados en los extractos. Son también sensibles a las variaciones de pH. A pH 3 el pigmento está presente como sales de flavilio de color rojo, a pH 8 es de color violeta y a pH 11 de color azul, como se muestra en la Figura N° 2.6 (Lock de Ugaz, 1997).

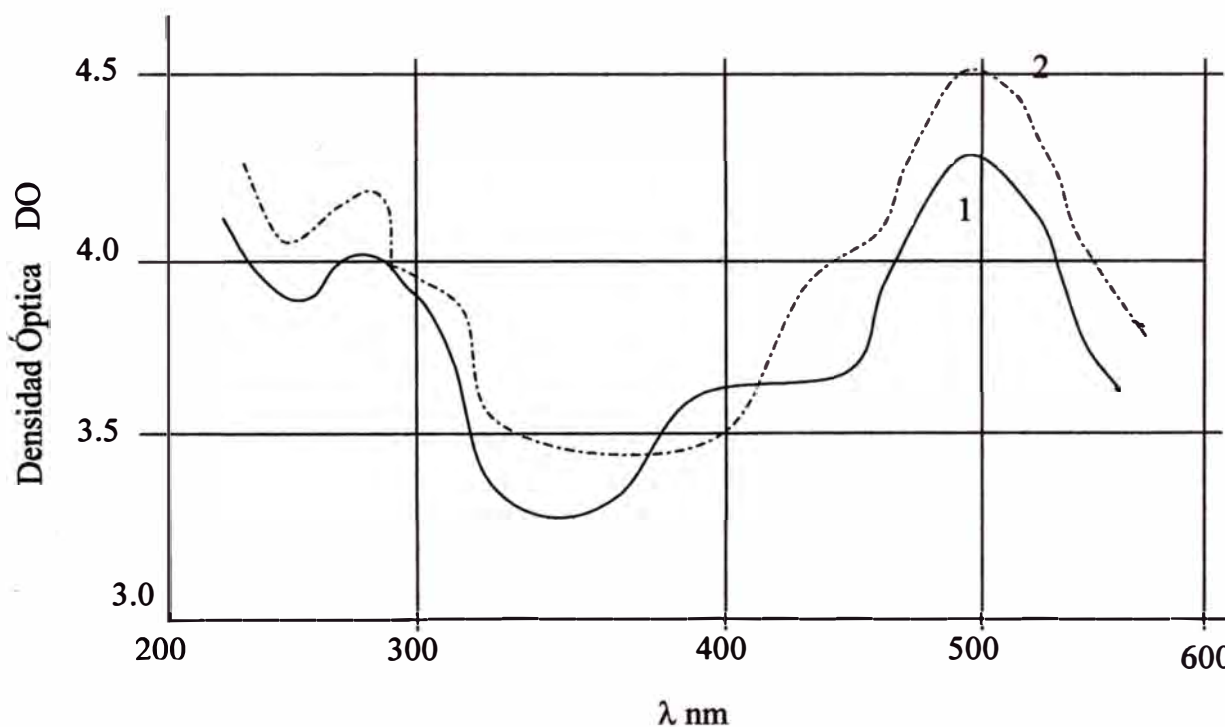
Figura N° 2.6 La antocianina y sus cambios de coloración



Las antocianinas de las flores han sido señaladas como marcadores genéticos y por ello son utilizados en la manipulación genética para obtener nuevas variedades de petunias, camelias, etc. Se ha encontrado que la deficiencia de fósforo en el suelo, la baja temperatura (de 0° C a 5° C) y la exposición a ozono, aumentan el contenido de antocianinas (Pollotron, 1984).

Aunque las antocianinas exhiben una intensidad de absorción característica en la región 500-550 nm, la diferencia en los espectros de las antocianinas es muy ligera (Figura N° 2.7). Por esta razón, medidas espectrales no eran usadas ampliamente en la identificación de las antocianinas naturales y sus agliconas, hasta que Bate-Smtih (1954) y Harbone et al (1957), introdujeron el uso de procedimientos de cromatografía de papel para la separación de las antocianinas puras desde los extractos crudos de las plantas.

Figura N° 2.7 Espectro visible de la (1) cianidina, (2) delphinidina



La intensidad y la posición del máximo visible de las antocianinas se desplaza considerablemente con los cambios de pH y solvente, el λ_{\max} disminuye sucesivamente en etanol, metanol acidificado y agua, por ejemplo la cianidina 3-ramnosa tiene un λ_{\max} de 507 nm en agua, 523 nm en metanol y 533 nm en etanol.

La adición de unas gotas de una solución de cloruro de aluminio también produce un desplazamiento batocrómico de 15-50 nm del λ_{\max} principal en aquellos

derivados de antocianinas que contengan grupos hidroxilos adyacentes. Los espectros de antocianinas que no contentan un grupo o-dihidroxilo no son afectados por la adición del cloruro de aluminio. Este reactivo fue introducido por Geissman (1953), y es ampliamente usado para distinguir antocianidinas como cianidina y peonidina, las cuales tiene espectros casi idénticos en alcohol.

En el Cuadro N° 2.3, se presenta los máximos de absorción de diez antocianidinas obtenidas de antocianinas naturales, los datos presentados, con excepción de la delfinidina y petunidina, pueden ser usados para diferenciar los espectros de las antocianidinas.

Cuadro N° 2.3 Espectro de antocianidinas en la región visible

Pigmento	λ_{\max} (nm) Metanol - HCl	λ_{\max} (nm) Etanol - HCl	Desplazamiento con AlCl ₃ (nm)
Hirsutidina	536	545	0
Malvidina	542	554	0
Petunidina	543	558	14
Delfinidina	546	557	23
Rosinidina	524	534	0
Peonidina	532	542	0
Cianidina	535	545	18
Pelargonidina	520	530	0
Luteolinidina	493	503	52
Apigenidina	476	483	0

Fuente: Geissman (1962)

Con pocas excepciones, las antocianinas naturales conocidas son 3 ó 5 monoglicósidos o 3,5 diglicósidos de las antocianidinas. La glicosidación de las antocianidinas produce un desplazamiento hipsocrómico en la longitud de onda de máxima absorción. Los 3-monoglucósidos de la pelargonidina, cianidina y

delfinidina, por ejemplo, tienen λ_{\max} de 506, 525 y 535 nm respectivamente (Cuadro N° 2.4). Adicionalmente los glicósidos de la cianidina, delfinidina y petunidina pueden ser distinguidos por su desplazamiento con cloruro de aluminio.

La presencia del azúcar en posición 3 ó 3,5 producen desplazamientos hipsocrómicos de 10-15 nm, por ejemplo cianidina (λ_{\max} , 535nm), cianidina 3-monoglicósido (λ_{\max} , 525), y cianidina 3,5 -diglicósido (λ_{\max} , 522). La presencia de un azúcar en posición 5 solamente resulta en un desplazamiento hipsocrómico de 7 nm, por ejemplo la pelargonidina (λ_{\max} , 520 nm), pelargonidina 5-monoglucósido (λ_{\max} , 513 nm). Sobre esta observación es posible distinguir 5-glicósidos de 3- glicósidos y 3,5- diglicósidos.

Cuadro N° 2.4 Longitudes de máxima absorción para las antocianinas

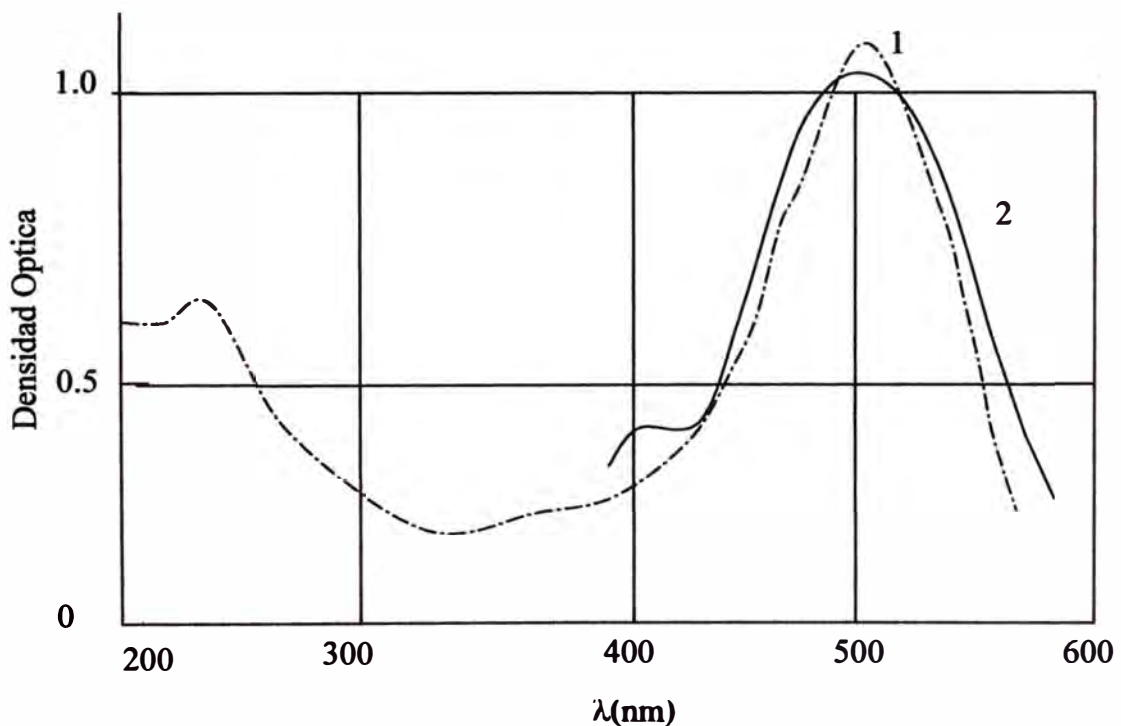
Cloruro de antocianina		$\lambda_{\text{max}}^{\text{a}}$ (nm)	E_{440}/E_{max} (as%)
Derivados de la Pelargonidina			
Con 5-OH	Pelargonidina	520	39
	Pelargonidina-3-monoglucósido	506	38
	Pelargonidina-3-gentobiosido	506	36
Con 5-OR	Pelargonidina-5-glucósido	513	15
	Pelargonidina-3,5-diglucósido	504	21
Derivados de la Cianidina			
Con 5-OH	Cianidina	535	19
	Cianidina-3-monoglucósido	525	22
	Peonidina	532	25
	Peonidina-3-monoglucósido	523	26
Con 5-OR	Cianidina-3,5-diglucósido	522 ^b	13
	Peonidina-3,5-diglucósido	523	13
	Peonidina-5-glucósido	528	12
Derivados de la Delfinidina			
Con 5-OH	Delfinidina	544 ^b	16
	Delfinidina-3-monoglucósido	535 ^b	18
	Petunidina	543 ^b	17
	Petunidina-3-monoglucósido	535 ^b	18
	Malvidina	542	19
	Malvidina-3-monoglucósido	535	18
Con 5-OR	Delfinidina-3,5-diglucósido	534 ^b	11
	Petunidina-3,5-diglucósido	533 ^b	10
	Malvidina-3 ramnosa 5-glucósido	533	12
	Negretina	536	9

^a Medidas en metanol con 0.01% HCl

^b Solo estos pigmentos tienen desplazamientos batocrómicos con la adición de cloruro de aluminio en etanol

Adicionalmente, Harbone (1957) observó que los espectros de estas antocianinas, en la cual el grupo hidroxilo en la posición 5 es libre, muestran un pico de absorción máxima importante en la región de 410-450 nm. En cambio, los 5-glicósidos y 3,5-diglicósido, muestran tan solo una inflexión de baja intensidad en esta región (Figura N° 2.8). Esta diferencia se hace aparente cuando la proporción entre la densidad óptica a 440 nm y el λ_{max} es calculada (Cuadro N° 2.4, E_{440}/E_{max}). Este porcentaje de intensidad a 440 nm de la antocianidina 5-O-sustituída es aproximadamente la mitad de la antocianidina correspondiente, en la cual el grupo hidroxilo en posición 5 es libre. Por tanto, esta proporción parece ofrecer una forma de distinguir entre el 3-glicósido y 3,5-diglicósido (Jurd, 1962).

Figura N° 2.8 Espectro U.V. en 0.01 % ácido clorhídrico en metanol

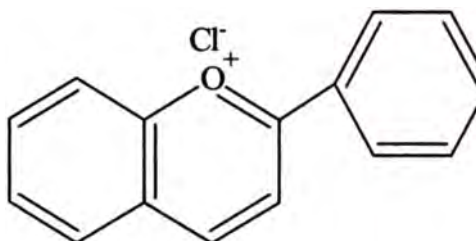


(1) pelargonidina 3-glicósido, (2) pelargonidina 3,5-diglicósido

2.2.1 Estructura

El núcleo general de las antocianidinas es el cloruro de 2-fenilpirilio o cloruro de flavilio (Figura N° 2.9) y están consideradas dentro del grupo de los flavonoides, ya que poseen el esqueleto característico C₆-C₃-C₆ y el mismo origen biosintético, pero difieren en que absorben fuertemente en la región visible del espectro.

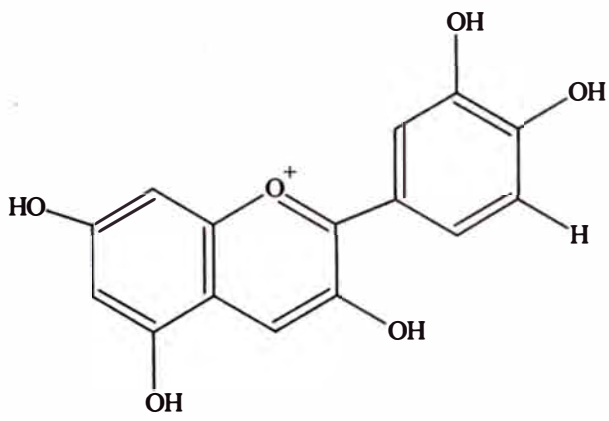
Figura N° 2.9 Cloruro de 2-fenilbenzopirilo o cloruro de flavilio



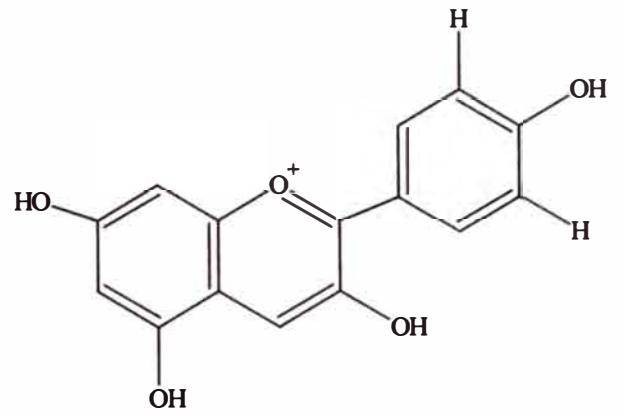
Existen 06 antocianidinas comunes, tal como se muestra Figura N° 2.10, siendo la cianidina la más común y responsable del color magenta, los colores rojo naranja se deben a la pelargonidina (con un grupo hidroxilo menos que la cianidina), mientras que los colores violeta y azul a la delphinidina (con un grupo hidroxilo más). También son muy comunes tres metil-éteres: peonidina, derivada de la cianidina, petunidina y malvidina, basadas en la delphinidina. Cada una de las 06 antocianinas ocurre con unidades de azúcar, la variación está en el tipo de azúcar, del número y la posición en los que están unidos. Entre los monosacáridos, comunes podemos mencionar la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa, arabinosa y como disacáridos a la rutinosa, sambubiosa, sofrorosa, gentiobiosa y latirosa (Figura N° 2.11).

Basadas en su glicosidación, pueden clasificarse como 3 monoglicósidos, 3,5-diglicósidos y 3,7-diglicósidos, siendo estos últimos los menos comunes. Si hubiera tres unidades de azúcar, las tres pueden estar en posición 3, o dos en posición 3 y una en 5 (Lock de Ugaz, 1997).

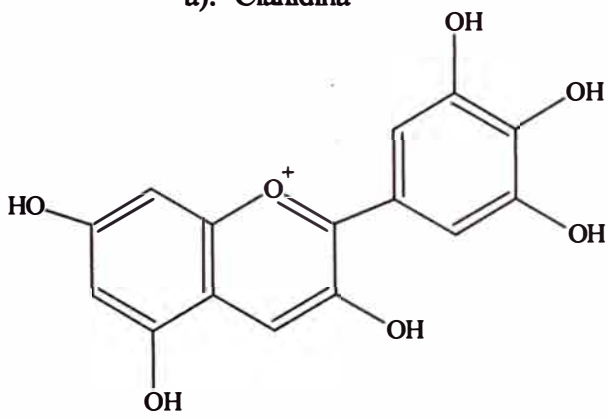
Figura N° 2.10 Principales Antocianidinas



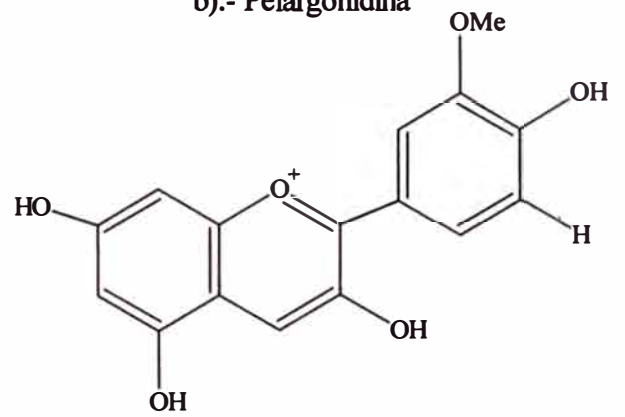
a).- Cianidina



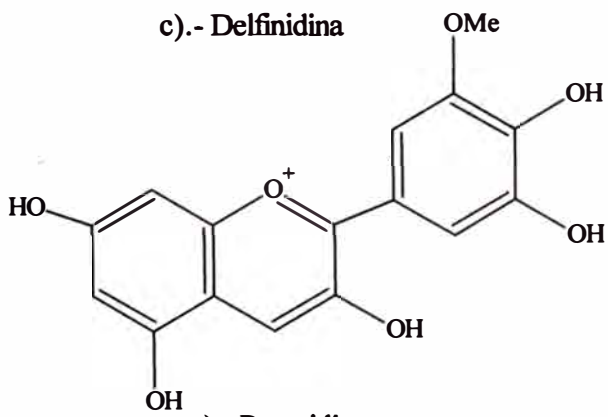
b).- Pelargonidina



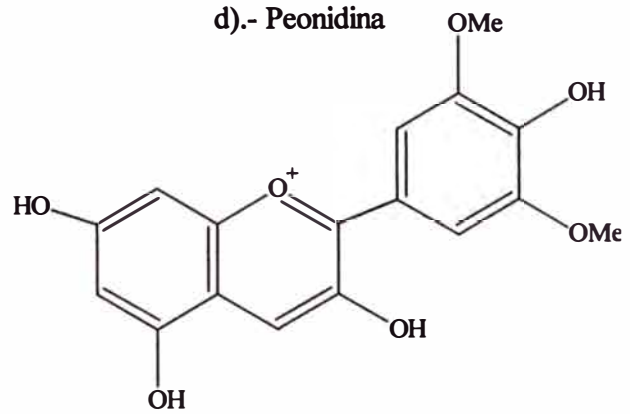
c).- Delphinidina



d).- Peonidina

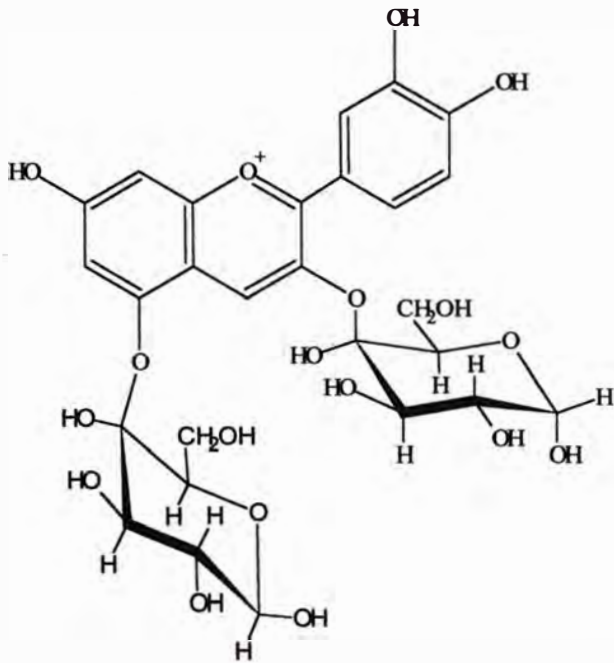


e).- Petunidina

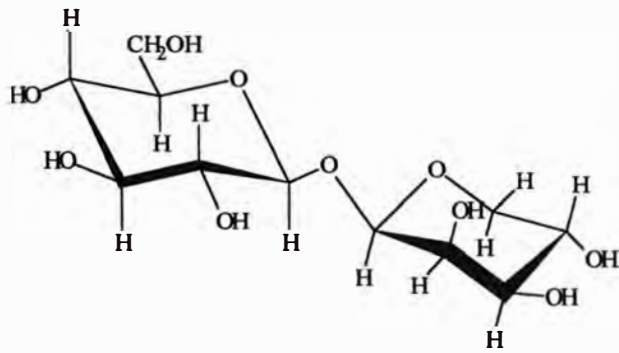


f).- Malvidina

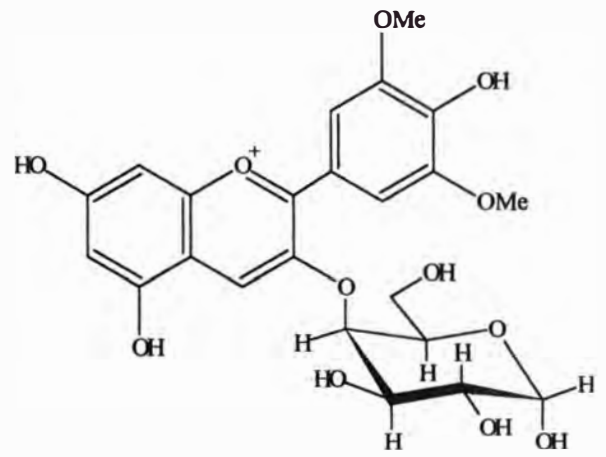
Figura N° 2.11 Antocianinas y biósidos



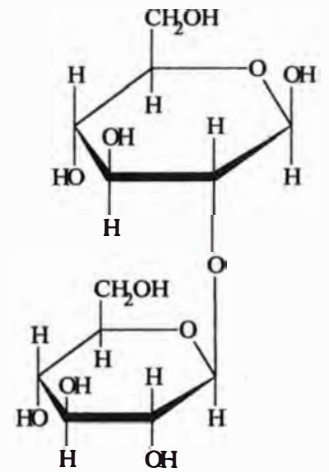
a).- Cianidina-3,5-diglucósido



c).- Sambubiosa



b).- Malvidina-3-galactósido



d).- Soforosa

2.2.2 Aislamiento de antocianinas

Todas las antocianinas son solubles en agua e insolubles en solventes no polares, como el éter, acetona, cloroformo y benceno. Las antocianinas son completamente precipitadas desde soluciones acuosas o alcohólicas en forma de sales de plomo, las cuales son solubles en ácido acético glacial para dar una solución color rojo intenso.

El aislamiento de antocianinas desde las plantas está basado principalmente en este modo de comportamiento y la cristalización final se realiza en general tomando en cuenta la ligera solubilidad de la sal de ozonio en agua o alcohol acidificados.

Como regla, las antocianinas son extraídas de las plantas mediante el empleo de 1 ó 2 % de ácido clorhídrico en metanol y seguidamente precipitados por la adición de tres veces el volumen de éter. Cuando la extracción se realiza con material fresco, la precipitación empleando acetato de plomo es un paso necesario en la purificación. El compuesto de plomo es entonces convertido a cloruro por disolución en 5% ácido clorhídrico en metanol y el pigmento es nuevamente precipitado con éter. Este procedimiento es repetido tantas veces como sea necesario, y la cristalización final se realiza con picrato o cloruro. Algunas antocianinas dan buenos cristales de picrato difícilmente solubles en agua fría (Cuadro N° 2.5); otros son obtenidos como cristales de cloruros propios de la moderada solubilidad de los cloruros en agua o alcohol ácido clorhídrico (por ejemplo pelargonidina, cianidina, peonidina, malvidina, hirsutidina).

Todos los métodos de aislamiento y purificación de antocianinas están basados en una combinación de los siguientes procedimientos: concentración al vacío del extracto crudo, purificación a través de la conversión de sales de plomo o picrato (Hayashi, 1962).

Cuadro N° 2.5 Algunas propiedades importantes de antocianinas representativas con propósito de identificación

	Estructura	Cloruro	Picrato
Derivados de la Pelargonidina			
Callistephin	3- β -glucósido	Filamentos finos, naranja-ligeramente rojos	Rojo brillante, rectángulos planos
Pelargonin	3,5 di- β -glucósido	Filamentos finos, rojo carmín ligero	
Derivados de la Cianidina			
Chrysanthemín	3- β -glucósido	Rojo púrpura, hojuelas rombohédricas	Prismas rojos o ligeramente prismáticos
Idaein	3- β -galactósido	Marrón rojizo, ligeramente prismático	Ligeramente rojo
Cyanin	3,5 di- β -glucósido	Marrón rojizo, tabletas romboédricas	Ligeramente rojo fino (fácilmente solubles)
Mekocyanin	3- gentobiosido	Ligeramente rojo	(fácilmente solubles)
Kereacyanin	3- rhamanosa	Marrón rojizo, ligeramente prismático	(fácilmente solubles)
Derivados de la Peonidina			
Oxycoccicyanin	3- β -glucósido	Rojo- violeta oscuro, ligeramente prismático	Marrón rojizo, plano ligeramente puntiagudo
Peonin	3,5 di- β -glucósido	Marrón rojizo ligero	Rojo – marrón ligero

Derivados de la Delfinidina			
Empetrin	3- β -galactósido	Rojo-marrón, hojuelas cilíndricas	Rojo carmín ligero
Delphin	3,5 di- β -glucósido	Rojizo-violeta, platos	
Delphinin	p-hidroxibenzoico éster de la delfinidina	Marrón profundo- rojo, tabletas prismáticas	Marrón - rojo, precipitado floculante
Violanin	p-hidroxicinámico éster de 3 ramanosa	Azul violeta, tabletas tetrahédrica	Ligero rojo cereza fino
Derivados de la petunidina			
Petunin	3,5 di- β -glucósido	Violeta, tabletas rectangulares largas o prismas	fácilmente solubles
Derivados de la Malvidina			
Oenin	3- β -glucósido	Primas, rojo profundo	Rojo carmín ligero
Uliginosin	3- β -galactósido	Rojo violeta, cristales lanosos	Rojo carmín ligero
Malvin	3,5 di- β -glucósido	Rojizo-violeta, prismas ligeros	Filamento fino, rojo cereza ligero
Ensatin	p-hidroxicinámico éster de 3 rhamanosa	Cristales granates	Rojo, ligeramente delgado
Derivados de la Hirsutidina			
Hirsutin	3,5 di- β -glucósido	Marrón profundo-rojo ligero	

Fuente: Geissman (1962)

2.2.3 Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas

Como se ha mencionado, las antocianinas poseen una “inestabilidad inherente”, por lo que debe tomarse precauciones para su manipuleo y procesamiento. Un conocimiento de los factores involucrados en su “inestabilidad” así como de los mecanismos de degradación es sumamente vital para una eficiente extracción y purificación y uso como colorante de alimentos. Los factores que influyen en la estabilidad de antocianinas son pH, temperatura, presencia de oxígeno, así como la interacción de otros componentes en los alimentos como el ácido ascórbico, iones metálicos, azúcares y copigmentos (Lock de Ugaz, 1997).

a) pH

Las antocianinas y especialmente las antocianidinas son extremadamente sensibles a las variaciones del pH. El pH es un factor que muestra un gran efecto sobre la calidad del color de fresas almacenadas y congeladas, la pérdida de color es mayor a pH altos (Sistrunk y Cash, 1970; Wrolstad et al., 1970).

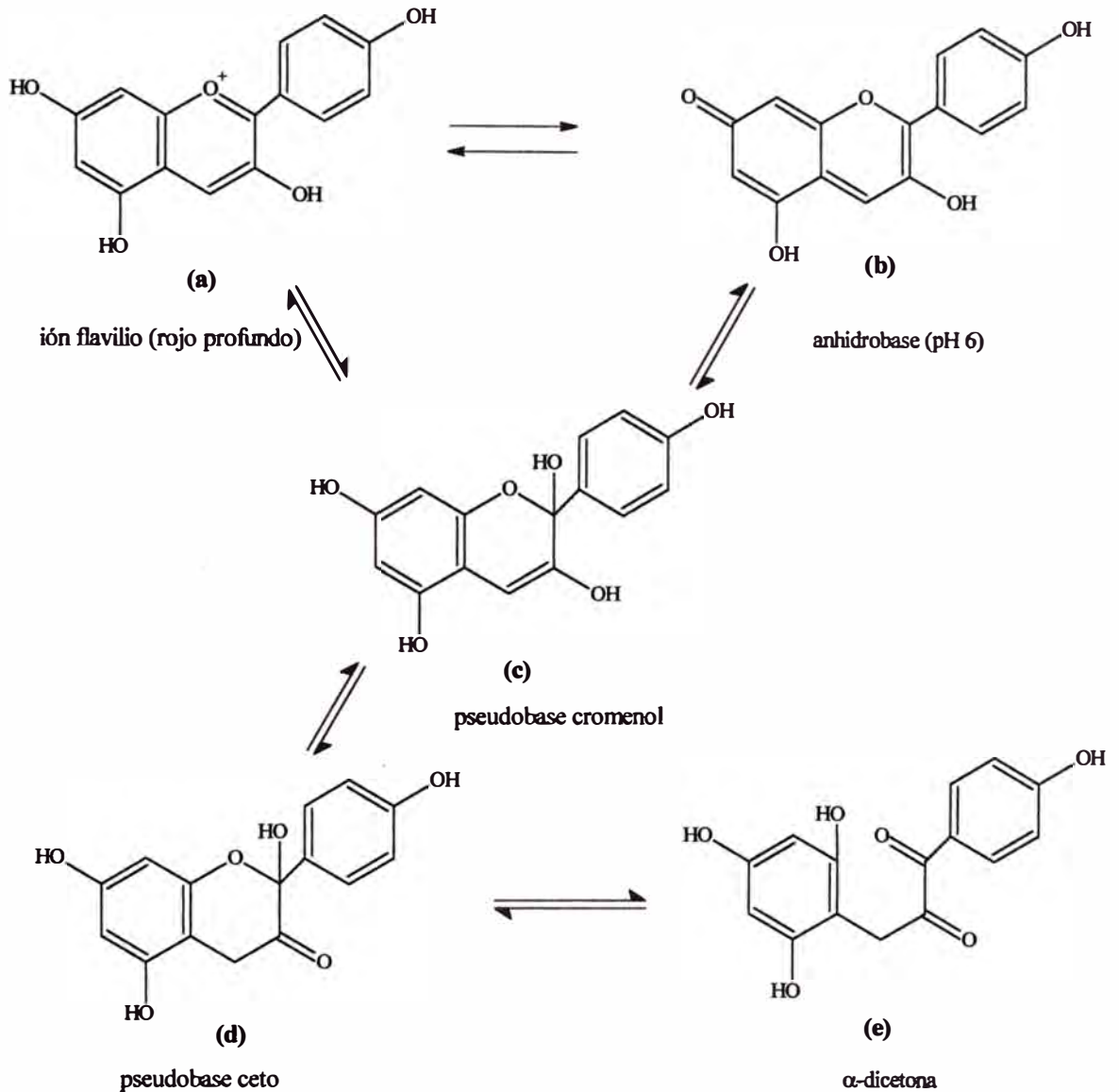
Wrolstad (1970) calculó que para que las fresas almacenadas y congeladas tengan un color apreciable deben estar a pH 3.51 ó menos. La velocidad de destrucción de la antocianina en presencia de oxígeno depende del pH y es proporcional al porcentaje del pigmento en la forma pseudobase (Lukton et al., 1956).

Las modificaciones en la estructura molecular inducidas por el pH han sido verificadas por estudios de espectroscopia y polarografía (Kuhn y Sperling, 1960; Jurd y Geissman, 1963; Timberlake y Bridle 1965). El pH de muchos extractos de plantas están en el rango de 3-6 (Hayashi, 1962), entonces sólo las transformaciones en medios ácidos ó neutros se deben considerar.

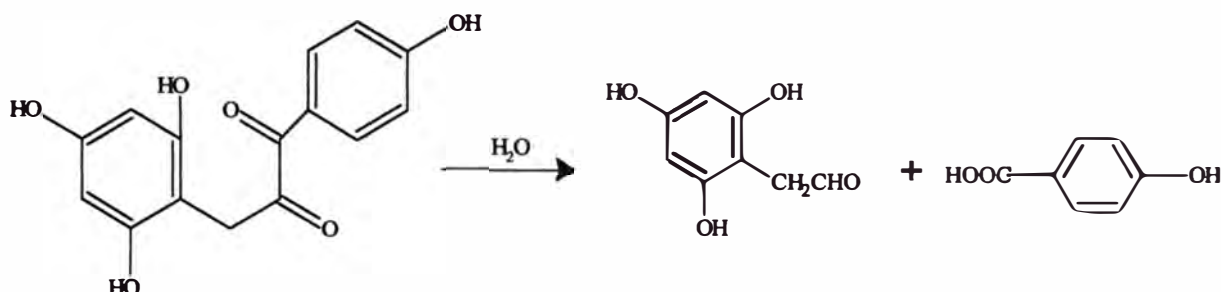
La acción combinada de las glicosidasas y el aumento del pH ayudan a la destrucción de las antocianinas. Harper (1968) ha descrito los cambios de la

estructura de la pelargonidina con el pH (Figura N° 2.12), basado en sus datos de espectros y polarografía. A pH menores a 3, el pigmento existe como ión flavilio, de color rojo profundo (a), a pH más altos éste es hidratado formando una pseudobase de menor color (c), la cual se encuentra en equilibrio con la pseudobase ceto (d). La forma ceto sufre la fisión del anillo para producir la α -dicetona (e), la cual aparece en el rango de pH de 3 a 7. La anhidrobases (b) se forma en cantidades apreciables a pH igual a 6, dando una solución púrpura. La decoloración que ocurre a pH mayores a 7, es atribuida a la formación de la pseudobase y α -dicetona.

Figura N° 2.12 Transformación de la Pelargonidina con el pH



Jurd (1972) notó que la cianidina en soluciones acuosas a pH 2 a 5 se descomponía irreversiblemente liberando ácido 3,4 dihidroxibenzoico desde el anillo B. Con la demostración de la formación de la α -dicetona y considerando que éstas son fácilmente hidrolizables a ácidos, se concluyó que la descomposición irreversible observada de las antocianinas, puede ocurrir por la formación de las α -dicetonas, las cuales luego hidrolizan a ácidos fenil-benzoicos. Ver Figura N° 2.13.

Figura N° 2.13 Formación de α -dicetonas

La existencia de un equilibrio entre la sal flavilio y el correspondiente anillo abierto de la 2-hidroxichalcona en soluciones acuosas ácidas está bien establecida para las sales flavilio sintéticas no sustituidas en la posición 3 (Jurd, 1963, 1964a, Timberlake y Bridle, 1966, 1967a; Harper y Chandler 1967a,b). El espectro del 3' metoxi - 4', 7 dihidroxi cloroflavilio, muestra una marcada disminución en la absorción a 468nm (λ máximo del catión) con el incremento del pH. La absorción a 373 nm se incrementa simultáneamente, reflejando la formación del 2-hidroxichalcona (Jurd, 1963). A pH 4 la sal flavilio existe principalmente en la forma de chalcona (90%). El equilibrio es marcadamente afectado por la luz, la cual favorece la formación del catión flavilio (Timberlake y Bridle, 1965; Jurd, 1969).

Apreciables cantidades en la forma catiónica coloreada de antocianinas, se mantienen bajo condiciones en las cuales las antocianidinas son rápidamente decoloradas. Las antocianinas en soluciones ácidas existen como mezclas en equilibrio de sales flavilio coloreadas y el carbinol ó cromenol menos coloreados (Sondheimer y Kertesz, 1953; Swain 1962; Timberlake y Bridle, 1966). El cromenol es bastante estable a temperatura ambiente y pueden ser rápidamente transformados a catión en condiciones ácidas.

Jurd y Asen (1966), observaron que las soluciones de cianidina 3-glucósido son rojas a pH mayores de 4. A pH mayores de 4, el λ máximo pasa de 510nm (λ_{max} de la sal flavilio) a 538 nm (λ_{max} de la anhidrobase). Las soluciones en el rango de

pH 4-5 son menos coloreadas. Ellos concluyeron que las antocianinas son inmediata y cuantitativamente convertidas a una base carbinol menos coloreada, por medio de la anhidrobase púrpura inestable. La anhidrobase es más estable sobre pH 5, pero a este pH pierde todo su color en una hora. Por otro lado, ni la reacción de disociación del ácido ni la desaparición del color rojo de las antocianinas, proceden directamente del ión flavilio a la anhidrobase, pero si por intermedio de la base carbinol.

El examen de los espectros de antocianinas antes mencionados, no indica la formación de chalconas en soluciones ácidas y neutras (Jurd, 1964a), pero si chalconas ionizadas en soluciones fuertemente alcalinas. El anillo A de las antocianidinas naturales son definitivamente hidroxiladas en las posiciones 5 y 7, lo cual incrementa la estabilidad de la forma catiónica coloreada (Timberlake y Bridle, 1967a) (Goodwin, 1976).

b) Reacción de Oxidación por Acido Ascórbico/ Oxígeno

La molécula de antocianinas deficiente en electrones es susceptible a un ataque nucleofílico por parte de los componentes naturales de las plantas y los aditivos de los alimentos. Dentro de estos compuestos o nucleófilos se encuentra el ácido ascórbico, el cual según ha sido demostrado (Beattie et al., 1934; Mechter, 1953; Markakis et al., 1957; Timberlake, 1960; Starr y Francis, 1968; Lewicki, 1973) acelera la degradación de antocianinas en frutas y vinos, esta velocidad de degradación aumenta grandemente con el incremento de los niveles de oxígeno y ácido ascórbico (Markakis et al., 1957; Starr y Francis, 1968).

El rol del O₂ en esta reacción fue reconocido y explicado anteriormente sobre la base de las propiedades de autooxidación del ácido ascórbico. La importancia del O₂ fue además indicado sobre el estudio de los efectos inhibitorios sobre el decoloramiento de las antocianinas por antioxidantes fenólicos como la quercitina. (Iacobucci, 1983).

Observaciones posteriores reafirmaron el rol esencial del oxígeno en la decoloración de antocianidinas por ácido ascórbico. Después de rigurosas exclusiones de aire, a través de repetidas evacuaciones y desplazamientos con argón, el ácido ascórbico fue incapaz de decolorar la apigenidina durante 10 días de almacenamiento, pero lo hizo en pocas horas luego que el aire fue admitido. El decoloramiento es el resultado de la oxidación del anillo pirilo de la apigenidina, el cual se evidencia por caracterizaciones con cromatografía de gases y espectrometría de masa encontrándose como productos de degradación: floroglucinol, hidroquinona y el ácido p-hidroxibenzoico.

Sugiriendo esto que la pérdida de color originado por el ataque directo del ácido ascórbico sobre el catión flavilio puede aparentemente ser descartado. En realidad, el bloqueo de la función autooxidable eno-diol del ascorbato por metilación o acilación, como es el caso del 3-O-metil y 2-O-isovaleril derivados, son mostrados en la Figura N° 2.14, inhibió el decoloramiento de la apigenidina en presencia del aire.

Esta observación condujo al desarrollo de preparados ricos en antocianinas con una mayor estabilidad de color, conteniendo el ácido 2-O-fosfatoascórbico como una fuente de vitamina C (Iacobucci,1983).

Figura N° 2.14 Decoloración del cloruro de apigeninidina (20 ppm)



▲ ácido ascórbico 500 ppm

● ácido 3-O-metil ascórbico

▲ 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 (10)

Por otro lado, el ácido ascórbico acelera la oxidación de antocianinas, excepto en presencia de iones cobre, estos muestran un efecto protector frente al ácido ascórbico (Clegg y Morton, 1968; Harper et al., 1969) (Goodwin, 1976).

Dos mecanismos han sido propuestos para la participación del ácido ascórbico en la degradación de antocianinas (Goodwin, 1976):

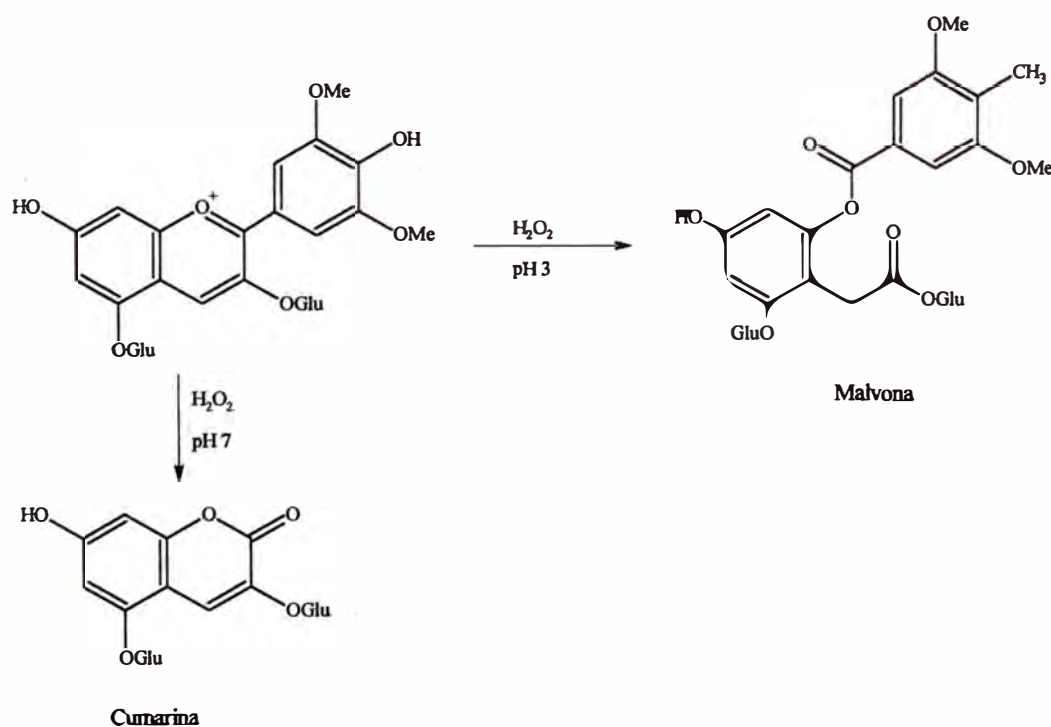
1. Oxidación de antocianinas por peróxido de hidrógeno formado por la autooxidación del ácido ascórbico (Sondheimer y Kertesz, 1952; Harper et al. 1969).
2. Condensación de antocianinas y ácido ascórbico (Jurd, 1972).

1. Reacciones con Peróxido de Hidrógeno

La reacción de la antocianina con el H_2O_2 fue investigado inicialmente por Karrer, quien encontró que la malvidina reacciona para dar la malvona (Figura N° 2.15). En la malvona un azúcar está unido como un éster y puede ser fácilmente removido por hidrólisis con $\text{NH}_3(\text{ac})$. Si el azúcar está unido a la posición 5 requiere de una hidrólisis ácida para ser removida. El método de oxidación con peróxido de hidrógeno puede ser sugerido para determinar las unidades de azúcar en carbono 3 y 5 (Iacobucci, 1983).

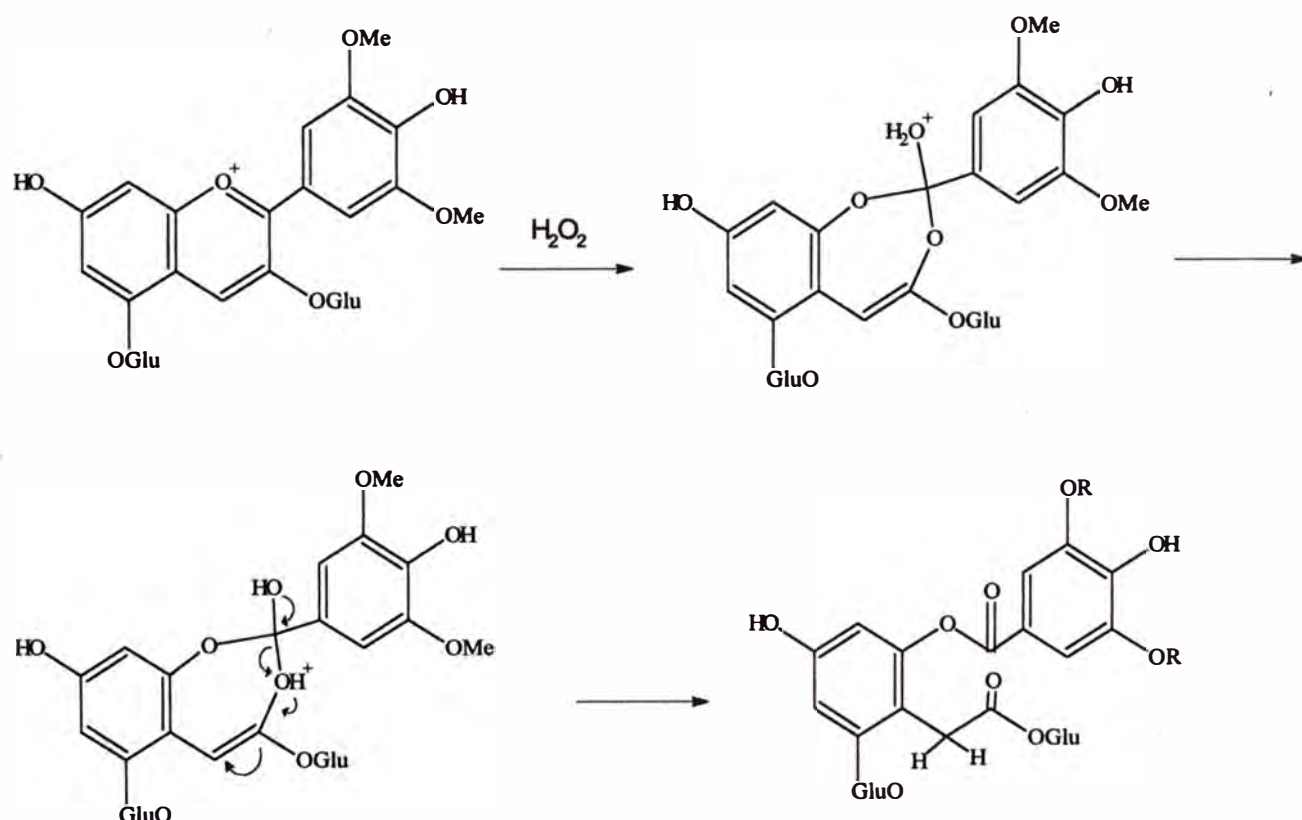
En muchos estudios recientes, se han encontrado que las reacciones toman diferentes cursos si se realizan a pH 7 en vez de pH 3, como el descrito por Karrer. A pH 7 la antocianina existe casi exclusivamente bajo la forma cromenol y da derivados de cumarina, como producto mayoritario (Iacobucci, 1983).

Figura N° 2.15 Reacción de las antocianinas con H_2O_2



Jurd (1966), propuso un tipo de oxidación conocido como oxidación Baeyer-Villiger, como mecanismo para la reacción de peróxido de hidrógeno con sales alquil-flavilio en soluciones acuosas (Figura N° 2.16). Una ruta similar a la sugerida por Hzardina (1970) como mecanismo para la oxidación de la 3,5-diglucósido. En este caso el ataque nucleofílico del agua sobre el ión carbonio es seguido por una migración de uno de los átomos de hidrógeno hacia el oxígeno en la posición 3 de los 7 miembros del anillo, resultando en la formación de la malvona (Goodwin, 1976).

Figura N° 2.16 Mecanismo propuesto para la oxidación por H_2O_2 de la malvidina 3-5-diglucósido



Las antocianidinas aciladas 3,5-diglucósidos son oxidadas por el peróxido bajo condiciones ácidas para dar el O-benzoiloxifenil éster de ácido acético acilado (Hzardina y Franzese, 1974). La formación de peróxido de hidrógeno del ácido

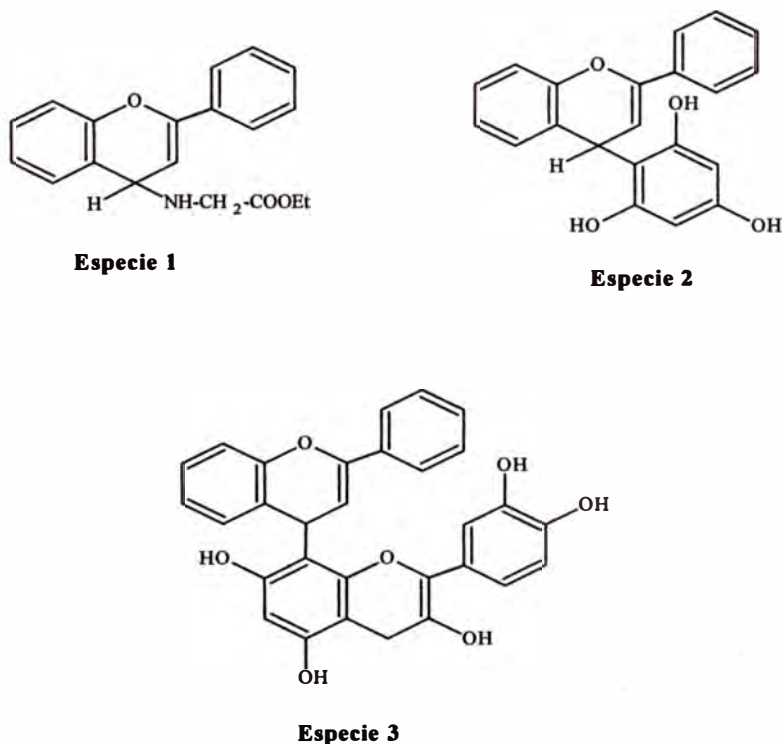
ascórbico y otras sustancias no garantiza que la cantidad formada sea suficiente y selectiva para la oxidación de antocianinas.

La decoloración de antocianinas es intensificada no solo por el ácido ascórbico, sino también por el azúcar y derivados del azúcar, aminoácidos y otros constituyentes de la planta (Goodwin, 1976).

2. Reacción de condensación

La condensación de antocianinas y sus componentes celulares, no han sido ampliamente explorado (Jurd, 1972). Las sales fenólicas de flavilio muestran una condensación con ésteres de aminoácidos (Shriner y Sutton, 1963), floroglucinol y catequinas, para dar las especies 1, 2 y 3 menos coloreadas, respectivamente (Goodwin, 1976).

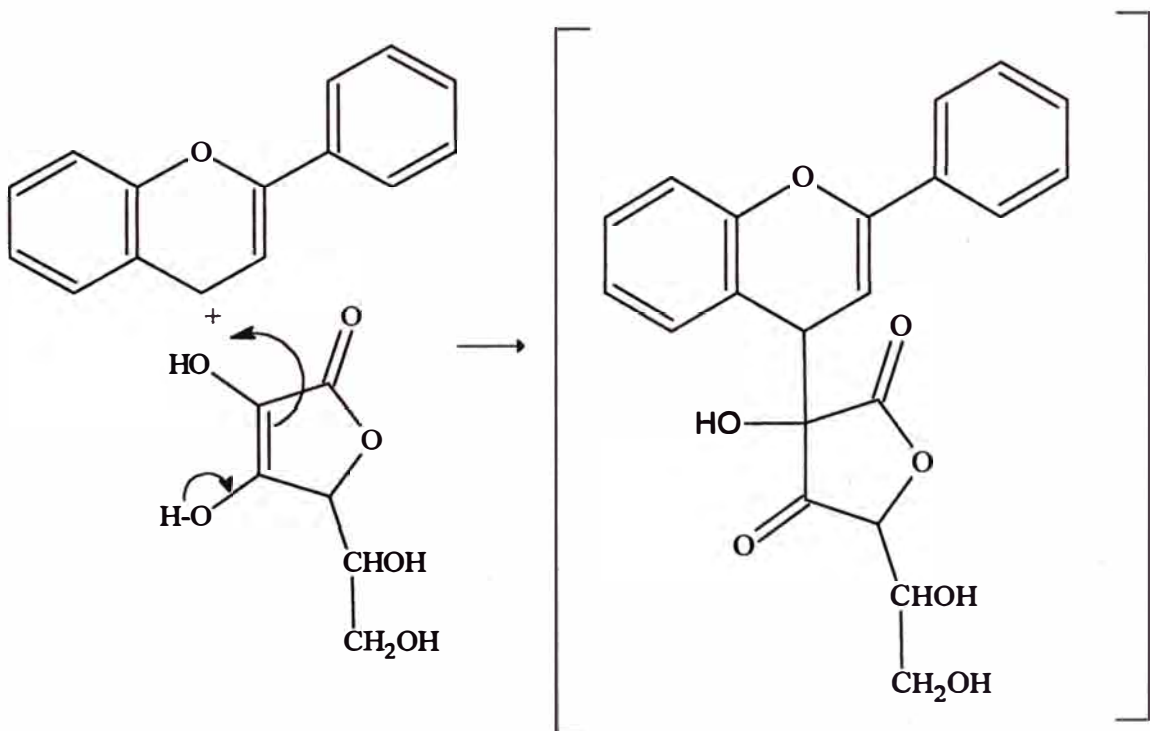
Figura N° 2.17 Productos de Condensación



Sin embargo, el grupo glicosídico en la posición 3 puede presentar problemas estéricos para este tipo de condensación. No obstante, este tipo de reacción es posible para las antocianinas. Bokuchava et al., (1972), reportó la formación de componente poliméricos desde la reacción de complejos tánicos con malvidina, petunidina purificadas y antocianinas de las uvas.

Las sales de flavilio sustituidos o no en la posición 3 pueden condensar rápidamente con el 5, 5 dimetil 1,3 ciclo hexanodiona en la posición 4 (Jurd y Bergot, 1965; Jurd, 1965). Desde que el ácido ascórbico se parece a una dimedona estructuralmente, Jurd (1972) postuló que esto puede reaccionar como en la Figura N° 2.18 (Goodwin, 1976).

Figura N° 2.18 Reacción de condensación de la sal de flavilio y el ácido ascórbico (Jurd,1972)



Esta hipótesis es aceptable por la habilidad del ácido ascórbico para reaccionar con el ión benzil carbono para formar productos c- benzil (Buncel et al., 1965) (Goodwin, 1976).

c) Efecto de los sustituyentes

La estabilidad de las antocianinas depende del tipo y posición de ciertos sustituyentes. Estudios en frutas y vinos mostraron que la velocidad de descomposición del 3-monoglucósido es de 1° orden, y que en el 3, 5-diglucósido se incrementa en el siguiente orden: pelargonidina, malvidina, peonidina, cianidina o petunidina y delphinidina (Keith y Powers, 1965; Robinson, 1966; Hzardina, 1970; Estévez-Pinto, 1972). Además, el grupo hidroxilo en la posición 3' incrementa la vulnerabilidad de la degradación del pigmento. El efecto del grupo metoxi es menos claro. Considerando resultados en la malvidina y peonidina, la sustitución del metoxi parece estabilizar el pigmento. Por otro lado, se ha encontrado que la malvidina se degrada más rápido que la pelargonidina indicando que el grupo metoxi hace al pigmento más susceptible a la descomposición. Los datos comparativos de la estabilidad entre la petunidina y cianidina son contradictorios (Keith y Powers, 1965; Hzardina, 1970). Aparte del conocido efecto protector del grupo glicosídico en la posición 3, el azúcar también tiene un comportamiento definido en la estabilidad. Los vinos que tienen monoglucósidos de antocianinas se decoloran más rápido a la exposición a la luz y al calor que aquellos que contienen diglucósidos (Van Buren et al., 1968). Diglucósidos acilados resisten mejor el fuerte efecto de la luz que sus correspondientes diglucósidos no acilados. Los pigmentos de arabinosa se degradan más rápido que los de galactosa (Starr y Francis, 1968) (Goodwin, 1976).

d) Decoloración Enzimática

Las enzimas son capaces de decolorar antocianinas que han sido obtenidas de cualquier fuente, flores y frutos (Huang, 1955, 1956; Peng y Markakis, 1963; Goodman y Markakis, 1965; Harbone, 1965). Experiencias In vitro, muestran que estas enzimas son efectivas para extraer los pigmentos de una variedad de frutas y plantas. Ellas caen dentro de dos tipos generales: las glucosidasas (antocianasas) y la polifenol oxidasas (fenolasas).

La decoloración por glicosidasas ocurre en dos pasos:

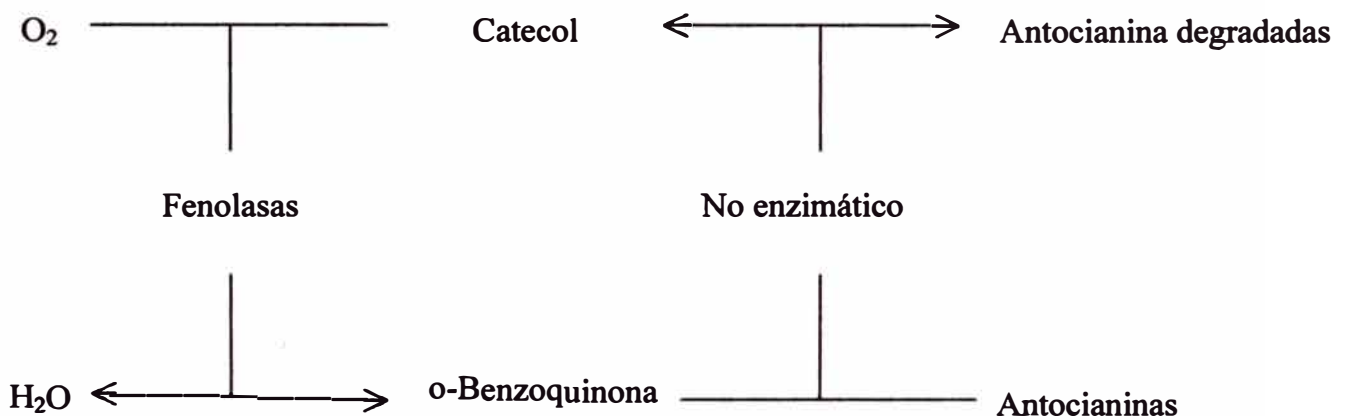
1. Hidrólisis enzimática de antocianina para dar antocianidina y azúcar.
2. Descomposición espontánea de la aglicona (antocianidina), la cual ha sido desestabilizada por la remoción del grupo glicosídico, resultando en pérdida de color irreversiblemente.

La decoloración de la antocianina por las fenolasas requiere la presencia de un catecol u otro o-dihidroxifenol para su activación (Wagenknecht et al., 1960; Peng y Markakis, 1963; Goodman y Markakis, 1965; Sakamura et al., 1966; Skalski y Sistrunk, 1973).

La actividad máxima es generalmente exhibida en el rango de pH 6-7 (Wagenknecht et al., 1960), en contraste con las glicosidasas que trabajan mejor en el rango de pH 3-5 (Huang, 1955, 1956; Boylen et al., 1969). Para explicar la participación del catecol, Peng y Markakis (1963) propusieron que la reacción fenolasa-catecol-antocianinas procede primero por la oxidación enzimática del catecol a o-quinona, seguida por la oxidación no enzimática de la antocianina por la o-quinona para dar un producto menos coloreado. La o-quinona por si sola no puede oxidar a las antocianinas.

La degradación de antocianinas no ha sido ligada directamente a la actividad de glicosidasas y fenolasas (Fennema, 1985).

Figura N° 2.19 Interacción de las antocianinas con polifenoles y el O₂



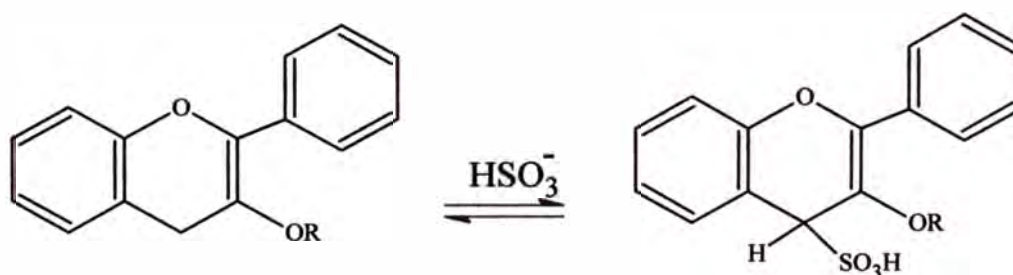
e) Decoloración con Sulfito

El dióxido de azufre en concentraciones moderadas es a menudo utilizado comercialmente en el procesamiento de frutas para prevenir el oscurecimiento y proliferación de bacterias. Desafortunadamente, el tratamiento crea otro problema de decoloración, blanqueo de antocianinas. Originalmente se pensaba que la decoloración con sulfito surgía a partir de la reducción del pigmento, esta asunción fue descartada por la observación de que el blanqueo de antocianinas puede ser rápidamente regenerado con ácido (Ribéreau-Gayon, 1959). Considerando que la velocidad de decoloración por dióxido de azufre es dependiente del pH, Ribéreau-Gayon sugirió que ello puede ser debido a la formación de una chalcona-bisulfito como producto de adición.

Debido a que evidenciar la formación de la chalcona desde antocianina era imposible, Jurd (1964a) evaluó la hipótesis de Ribéreau-Gayon usando el 4', 7

dihidroxi - 3 clorometoxi flavilio, un componente conocido para formar la chalcona. El espectro de esta sal de flavilio en solución acuosa a pH 3.8 muestra la absorción del catión flavilio y la chalcona. Como la solución es decolorada instantáneamente con la adición de bisulfito de sodio, la absorción del catión flavilio desaparece inmediata y completamente, mientras que el pico de la chalcona remanente permanece inalterable. El catión no la chalcona, es por lo tanto, la forma reactiva en la decoloración por sulfito. Se piensa que el producto es la forma menos coloreada cromenol 4(ó 2) - ácido sulfónico (Figura N° 2.20) (Goodwin, 1976).

Figura N° 2.20



Estudios cinéticos de Timberlake y Bridle (1967b) confirman la formación de un complejo entre el dióxido de azufre y el catión flavilio. Flavilio sintéticos con grupo metil o fenil en la posición 4 no son afectados por el dióxido de azufre (Timberlake y Bridle, 1968).

f) Degradación Térmica

La degradación de antocianinas durante el proceso de calentamiento de alimentos es un fenómeno bien conocido. La cinética es generalmente de primer orden por encima de los 110 °C (Lukton et al., 1956; Markakis et al., 1957; Keith y Powers, 1965; Tanchev, 1971, 1972a,b; Tanchev e Indocheva, 1972), e influenciada por la temperatura, variedad de la planta, pH, presencia de oxígeno y contenido de azúcar (Mechter, 1953; Lukton et al., 1956; Daravingas y Cain, 1968; Tanchev e Indocheva, 1972) (Goodwin, 1976).

Para prevenir la destrucción térmica de antocianinas en uvas, El-Gindy et al., (1972) recomendó que la temperatura no debería exceder los 63 °C (145 °F), esto básicamente de acuerdo con los hallazgos de Decareau et al. (1956), que una temperatura de 60 °C es la más alta posible para ser usada en pigmentos de fresas sin la apreciable pérdida del pigmento. La descomposición térmica es también inhibida por una disminución en el pH y la exclusión del oxígeno (Markakis et al., 1957; Daravingas y Cain, 1968) (Goodwin, 1976).

Dos hipótesis han sido presentadas para explicar la degradación térmica de antocianinas (Goodwin, 1976):

1. Ruptura hidrolítica del anillo pirilo para formar una chalcona sustituida, la cual se degrada dando un compuesto polifenólico insoluble de color marrón.
2. Hidrólisis de la unión 3-glicosídica; soluciones de la aglicona calentada a 45° C por 4 días no produce precipitado rojo marrón como principal producto de la degradación de la pelargonidina 3 monoglucosídica. La velocidad de liberación del azúcar desde soluciones ácidas de la cianidina 3-glucosídica a 100 °C, paralelamente la pérdida del color y la desaparición de la antocianina, indican que la hidrólisis glicosídica es la principal reacción en el proceso de decoloración.

g) Formación de complejos metálicos

Las antocianinas que contienen o-dihidroxis pueden quelar con metales, produciendo colores diferentes a la forma del pigmento libre. Algunos de estos complejos de metales coloreados, en contraste con la anhidrobase libre son marcadamente estables en el rango de pH de 4-6 (Jurd y Asen, 1966; Chandler y Clegg, 1970; Jurd, 1972). La formación máxima del complejo entre la cianidina 3-glucósido y el aluminio ocurre a pH 5.5, el complejo color cereza formado a este pH es estable a largos periodos de almacenamiento y exposiciones a la luz (Jurd y

Asen, 1966). De igual forma las sales ferrosas y férricas dan complejos azules estables, pero la formación máxima de complejo en este caso se da a valores cercanos a pH 5.5.

El color de la solución del complejo de cianidina 3-glucósido con la sal de aluminio cambia de rojo a azul violeta con los incrementos de pH, este cambio es más pronunciado en el rango de pH de 3.0 a 3.5 (Asen et al., 1969). Los bruscos cambios de color del complejo de aluminio-anhidrobasa con pequeños cambios de pH fueron presentados por Asen como una posible explicación del cambio de color a azul de algunas flores rojas con la edad. El pH de las flores incrementa con la edad y la anhidrobasa es considerada también inestable por tener una coloración azul.

Complejos de antocianinas con el ión estañoso también producen coloración azul. Complejos de estaño con antocianinas y delfinidina glicosidada son responsables de la aparición de un fuerte color azul en los jugos de moras (Pyysalo y Kevusi, 1973). Luh et al., también reportaron que los duraznos enlatados con altos contenidos de antocianinas reaccionaban con el ión estaño bajo condiciones de proceso causando una decoloración azul o púrpura.

Sistrunk y Cash (1970), observaron que los cloruros estañoso y estánico y el cloruro de aluminio pueden estabilizar el color del puré de fresas (Goodwin, 1976).

2.3 Análisis de Antocianinas

2.3.1 Introducción

El Arándano y otros frutos, así como los preparados a partir de estos deben su atractivo color a la presencia de pigmentos de antocianinas. El contenido total de antocianinas en estos frutos varía grandemente dependiendo de factores como la variedad de la especie, condiciones de crecimiento, tamaño, la posición de la fruta en la planta, aplicación de químicos, entre otros.

La extracción de antocianinas es necesariamente el primer paso para la determinación de las antocianinas totales, así como las individuales en cualquier variedad de planta. El método de extracción debe ser aquel con el que se recupere el mayor contenido de antocianinas con una mínima cantidad de reactivos y una mínima pérdida de antocianinas debido a cambios enzimáticos y no enzimáticos.

Esto se alcanza usualmente mediante la extracción del material vegetal con HCl 1 % en metanol.

El contenido total de antocianinas puede a menudo ser determinado en extractos crudos que contienen otros compuestos fenólicos que existen 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 (Sondheimer et al., 1948 a).

Un método simple y directo para la determinación de antocianinas totales fue usado en estudios previos en el arándano, donde la absorbancia fue medida a 535 nm (Fuleki y Francis, 1968a). 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 absorción máxima y la absorptividad molar usadas en los métodos espectrofotometría son marcadamente afectados por el pH, presencia de ciertos metales, tiempo de reposo, temperatura, etc. Adicionalmente, la relación directa 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 con los resultados obtenidos por diferentes investigadores. Sondheimer et al. (1948b) 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. 1967a).

La mejor manera de expresar los resultados del total de antocianinas es en términos de cantidades absolutas de antocianinas presentes en una mezcla particular. Para esto es necesario establecer no solo la identificación del pigmento, sino también su coeficiente de extinción en el solvente usado para la determinación del total de antocianinas y la proporción de cada pigmento.

El método simple para la determinación del total de antocianinas no puede ser empleado debido a la interferencia de la clorofila y otros productos de degradación formados durante el almacenamiento del producto. Otra técnica

disponible está basada sobre las medidas de DO antes y después de la destrucción del color debido a las antocianinas (Fuleki et al., 1968b), en el extracto o la remoción de producto degradado antes de medir la concentración de antocianinas, esta técnica es denominada Método de pH Diferencial.

La acumulación de producto degradado incrementa la absorción en la región de 400–440 nm, mientras la pérdida de antocianinas es reflejada en la disminución de la densidad óptica (D.O.) de la máxima absorción de antocianinas. Este fenómeno puede ser utilizado para el cálculo de un índice de degradación, el cual es un indicativo de la fracción de antocianinas degradadas en la muestra.

2.3.2 Mediciones Espectrales

La absorción máxima y los valores de E fueron establecidos por Fuleki (1967), empleando extracto de arándano y antocianinas de arándano purificadas, diluidas en un solvente apropiado. Fuleki, (1968), empleó un equipo de espectrofotometría para la determinación total de antocianinas. Usando agua destilada como blanco, debido a que se estableció que no existía diferencias de absorción en la región espectral comprendida en el rango de 250-650 nm y otros medios usados para la determinación total de antocianinas.

2.3.3 Procedimiento de Extracción

El procedimiento de extracción fue realizado con 100 gramos de arándano (cranberry) congelado, el cual fue mezclado con 100 mL de solvente de extracción (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 de extracción 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: Primer extracto). El vaso con los residuos fue lavado repetidamente con el solvente extractor hasta obtener otros 215 mL y se enrrasó cuantitativamente en una fiola a 250 mL (rotular B: Primer lavado). Una tercera fracción llamada «lavados secundarios» fue obtenida mediante el lavado del residuo con 85 mL del solvente de extracción y se enrrasó cuantitativamente a 100 mL (rotular C: Segundo lavado).

Para la evaluación de la eficiencia de extracción, se trabajaron con 6 muestras de arándano y la cantidad de antocianinas totales presentes en cada fracción fue determinada usando el método descrito por Fuleki, llegando a los siguientes resultados (Cuadro N° 2.6):

Cuadro N° 2.6 Recuperación de antocianinas totales del arándano extracción con EtOH - HCl 1,5N (85:15)

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

¹Error estándar de la media

De la evaluación del método de extracción se puede concluir que la mayor parte de las antocianinas fue extraída en los primeros 250 mL del solvente de extracción. Y que un primer lavado de los residuos con una porción adicional de 250 mL del solvente de extracción remueve prácticamente toda la antocianina.

2.3.4 Determinación de Antocianinas Totales

El método seguido es el descrito Fuleki y Francis (1968b), denominado Método de pH Diferencial, el cual consiste en la dilución de 10 mL de muestra a 250 mL y 50 mL con los buffers de pH 1.0 y 4.5 respectivamente, estas muestras diluidas alcanzan el equilibrio en 2 horas en un ambiente oscuro a temperatura ambiente. La densidad óptica de la muestra fue medida a 510 nm usando agua destilada como blanco. La variación de la DO (ΔDO) fue obtenida por diferencia del total de la DO a pH 4.5 ($DOT_{ph4.5}$) del total de la DO a pH 1.0 ($DOT_{ph1.0}$).

Ambos valores fueron calculados con la densidad óptica leída empleando la dilución y los factores de cálculo apropiados. El total de antocianinas (AcyT) en mg es calculado con la ayuda de los coeficientes de extinción establecidos para las antocianinas del arándano.

Los siguientes productos fueron usados para la obtención de los buffers:

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

Buffer a pH 4.5: Acetato de Sodio 1.0 N – HCl 1.0 N – Agua (100:60:90).

El pH de los buffers fue ajustado para obtener un pH final de 1.0 y 4.5.

a) Cálculo de la Densidad Óptica Total para el volumen de extracción

La densidad óptica total (D.O.T) para las antocianinas a pH 1.0 y pH 4.5, es calculada usando la siguiente ecuación:

$$D.O.T \equiv D.O * DV * VF \dots\dots\dots(2.1)$$

Donde:

DO = absorbancia leída sobre la muestra diluida

DV = Volumen en mL, al cual se diluye el extracto para la medición de la densidad óptica (D.O.)

VF = Factor de corrección del volumen, el cual corrige la diferencia entre el volumen original de extracción (VO) 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, VO / SV.

b) Diferencia entre la Densidad Óptica Total determinada a pH 1.0 y a pH 4.5

$$\Delta D.O. \equiv D.O.T_{pH1.0} - D.O.T_{pH4.5} \dots\dots\dots (2.2)$$

c) Contenido Total de Antocianinas para el volumen de extracción (mg / VO mL de extracto)

El contenido total de antocianinas en mg por 100 mL de extracto o para el volumen VO, es calculado desde el valor de ΔDO con la ayuda del valor promedio (av) de los coeficientes de extinción a 510 nm para las antocianinas de arándano (Cuadro N° 2.7).

$$AcyT \equiv \frac{\Delta D.O}{av \Delta E 510 / 10} \equiv \frac{\Delta D.O}{77.5} \dots\dots\dots (2.3)$$

E = 775, es la variación promedio del coeficiente de extinción molecular promedio para la cianidina y pelargonidina del arándano en medio acuoso a pH 1.0 y pH 4.5, reportado por Fuleki y Francis (1968b).

Cuadro N° 2.7 Coeficientes de Extinción para antocianinas de arándano en medios acuoso

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

d) Cálculo del contenido de antocianinas en jugos frescos

En jugos con pigmentos no degradados, es suficiente el uso del método del pH simple para la determinación del total de antocianinas (Fuleki et al., 1968). La densidad óptica es medida a 510 nm sobre la muestra diluida con buffer a pH 1.0. La densidad óptica total (DOT) es calculada usando la ecuación (2.1) El contenido total de antocianinas (AcyT) es calculado de la siguiente manera:

$$AcyT = \frac{D.O.T_{pH\ 1.0}}{\alpha v E 510 \frac{1\%}{1cm} / 10} = \frac{D.O.T_{pH\ 1.0}}{87.3} \dots\dots\dots (2.4)$$

E = 873, es el coeficiente de extinción molecular promedio para la cianidina y pelargonidina del arándano a pH 1.0, reportado por Fuleki y Francis (1968b).

2.3.5 Método de Evaluación de Antocianinas Totales

La precisión del método fue evaluado (Fuleki et al., 1968), por el análisis de 10 muestras idénticas extracto de arándanos. La variación que fue encontrada esta dentro de los niveles aceptables de error (coeficiente de variabilidad 1.4%).

El método de extracción y determinación de las antocianinas totales (AcyT) desarrollado para el arándano puede ser usado para otras plantas, y productos sólidos o semisólidos que contengan antocianinas sin dificultad. En casos donde se presentes los productos degradados, el método de pH diferencial (pH 1.0 y pH 4.5) debe ser usado, de lo contrario el método de pH simple (pH 1.0) es el adecuado.

Cuando las antocianinas analizadas se encuentren en productos o plantas, las antocianinas son extraídas como primer paso.

Con muestras que contienen clorofila el método para la determinación de AcyT puede ser aplicado después de efectuar lavados del extracto con éter etílico para remover la clorofila. Para otras plantas cuyo coeficiente de extinción (E) no puede ser determinado, entonces la mejor aproximación es el cálculo de AcyT contenido, usando los valores de E establecidos para antocianinas del arándano. 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.

2.3.6 Índice de Degradación

El análisis de antocianinas totales en jugos u otros productos almacenados durante largos períodos de tiempo introduce el problema de que no se puede aplicar las técnicas normales para la determinación de antocianinas totales (AcyT), 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), también puede absorber a 510 nm, longitud de onda donde se realiza la determinación de las antocianinas totales (AcyT) y se pueden introducir errores si se efectúa la determinación directa de AcyT bajo estas condiciones. Fuleki et al (1968), empleando el método del pH diferencial y el pH simple, 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.

El índice de degradación indica el grado de descomposición de antocianinas en las muestras, como un índice es ampliamente usado, particularmente en casos donde el contenido original de antocianinas no es conocido y la medida del estado de degradación de antocianinas es necesario.

e) Cálculo del índice de degradación

El índice de degradación es calculado de la siguiente manera:

$$ID = \frac{AcyT \text{ por el método del pH simple}}{AcyT \text{ por el método del pH diferencial}} \dots\dots\dots (2.5)$$

$$ID = \frac{D.O.T_{pH 1.0} / 87.3}{\Delta D.O. / 77.5}$$

2.4 Purificación de antocianinas

Varios métodos han sido descritos por Francis y Fuleki (1968c), para la purificación preliminar de antocianinas individuales, tales como: precipitación con acetato de plomo, el empleo de cromatografías con columnas de poliamida, columna de celulosa y resinas de intercambio iónico.

Con el fin de eliminar impurezas (azúcares) se han realizado dos técnicas de purificación: precipitación con acetato de plomo y cromatografía de intercambio de iones.

2.4.1 Precipitación con acetato de plomo

La precipitación de antocianinas como sales de plomo es el método más usado para la separación de antocianinas de otras constituyentes de las plantas. Las antocianinas no son el único grupo de compuestos presente en los extractos vegetales que son capaces de formar sales de plomo, ligeramente solubles. Los compuestos que tienen un grupo carboxilo libre (orgánicos, fenólicos, grasos, aminoácidos y proteínas) u otros grupos nucleofílicos como el grupo hidroxilo fenólico (flavonoides, taninos etc.), también precipitan con acetato de plomo. Debido a que el acetato de plomo precipita numerosos componentes vegetales no solo antocianinas, este método no es el más adecuado para la purificación final de antocianinas, sin embargo es muy útil para la purificación preliminar de antocianinas presente en extractos acuosos o alcohólicos.

Las antocianinas son concentradas usando una mínima cantidad de alcohol HCl o H_2SO_4 para liberar los pigmentos de sus sales de plomo. El precipitado de sal de plomo formado después de la adición del ácido es retirado por centrifugación. El ácido acético no es usado para la regeneración de antocianinas 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.

Las reacciones de las antocianinas con el acetato de plomo no han sido muy comprendidas, pero se conoce que debido al carácter anfotérico de las antocianinas, la reacción entre el plomo y la antocianina es dependiente del pH. Debido a que el pH óptimo para la formación del precipitado es diferente para los varios tipos de antocianinas, algunas fracciones pueden ser realizadas por ajuste de pH (Thompson, 1959).

De acuerdo con Geissman (1959) y Hayashi (1962), mencionados por Fuleki, la presencia de grupos hidroxilos libres adyacentes a la molécula de antocianina es favorable para la formación de sales de plomo insolubles. En consecuencia, glicósidos de la cianidina, delfinidina y petunidina son precipitados a un pH más bajo que para la pelargonidina, peonidina y malvidina. Esto indica que el grupo hidroxilo fenólico de las antocianinas que contienen un grupo o-hidroxilo libre es más ácido que aquellos que no contienen a estos como grupos terminales. Esta diferencia de reactividad entre antocianinas es utilizada con propósitos de identificación usando acetato de plomo como agente cromogénico.

En análisis de jugos de uvas y vinos, se emplean métodos de precipitación fraccionada de antocianinas usando acetato de plomo básico seguido de acetato de plomo neutro o acetato de plomo neutro con ajuste de pH.

Considerando la inestabilidad de las antocianinas en medios alcalinos, es imprudente incrementar el pH a un nivel más alto o usar acetato de plomo básico. De acuerdo con Sengewald (1961), el acetato de plomo podría causar alguna degradación de antocianinas, particularmente en medios que no son altamente ácidos. Onslow (1925), notó que la precipitación con acetato de plomo presenta el mismo riesgo que el uso de un álcali. De acuerdo con Willstater et al. (1913), la degradación de antocianina en este caso es debido al exceso del agente alcalino y

al tiempo de exposición. Sin embargo, Stasunas (1955), encontró que el error promedio en la recuperación de antocianinas sintéticas añadidas a vinos rojos fue del 4%, luego del tratamiento con acetato de plomo básico. Sengewald (1961) reportó una recuperación del 92.5% de antocianina del vino rojo híbrido después de usar acetato de plomo neutro y amonio para precipitar los pigmentos. (Fuleki, 1968).

2.4.2 Cromatografía en columnas de poliamida

En comparación con otros flavonoides, se ha hecho poco uso de la poliamida como absorbente en el análisis de antocianinas. Chandler (1959), encontró que las antocianinas y las antocianidinas eran ligeramente retenidas en columnas de poliamidas, siendo fácilmente eluidas por el solvente usual de antocianinas con suficiente cantidad de ácido para prevenir la pérdida del pigmento. Las antocianinas fueron exitosamente separadas de otros compuestos flavonoides, los cuales fueron completamente retenidos. El procedimiento seguido es descrito por Chandler (1962), mencionado por Fuleki (1968c.).

La desventaja de esta técnica es que se obtienen una gran dilución de la solución de antocianinas.

2.4.3 Cromatografía con resinas de intercambio iónico

Todos los flavonoides excepto las chalconas (Bates-Smith, 1953), son absorbidas de las soluciones acuosas por la resina (Amberlita CG-50). Muchos de los compuestos orgánicos solubles en agua e impurezas orgánicas pueden ser removidas por exhaustivos lavados con agua. Los glicósidos pueden ser eluidos con soluciones alcohólicas y las agliconas con alcohol al 95%.

Este mecanismo de adsorción no está claramente entendido. Varios tipos de resinas pueden ser usados para la purificación preliminar de antocianinas, pero

existe muy poca información de la recuperación cuantitativa de antocianinas de columnas de intercambio iónico. Parkinson (1954) entre otros, citado por Fuleki, notaron que un efluente coloreado (usualmente naranja o marrón), ocurría después del lavado de las antocianinas absorbidas sobre la columna con agua (Fuleki y Francis, 1968c).

CAPITULO 3 ESTUDIO EXPERIMENTAL DE SEPARACIÓN DEL PIGMENTO DE LA CASCARA DEL CAMU-CAMU

3.1 Generalidades

Inicialmente se trabajó con una muestra de camu-camu fresca (a temperatura ambiente), la cual fue pelada manualmente, observándose que la cáscara arrastraba gruesas capas de pulpa, obteniéndose un rendimiento de cáscara/fruta de 25%, tal como se muestra en el Cuadro N° 3.1. Paralelamente se siguió el mismo procedimiento, sobre muestra congelada, obteniéndose una cáscara más libre de pulpa. En el cuadro mencionado, se puede observar que la relación cáscara/fruta disminuye en un 50%, con lo cual se evita la formación de un precipitado que degrada el extracto en corto tiempo.

Cuadro N° 3.1 Porcentajes de rendimiento de cáscara por fruta

N° de Ensayo	Fruta sin Congelar	Fruta Congelada
1	26%	15.04%
2	30%	12.79%
3	22.43%	14.65%
4	22.85%	15.80%
5	24.7%	9.48%
Promedio	25.2%	13.55%

La cáscara obtenida en esta etapa, sobre la cual se realizó la extracción del pigmento (Figura N° 3.1), es la base para el presente estudio de investigación. La Figura N° 3.2 muestra el procedimiento empleado en este trabajo, el cual se desarrollo de la siguiente manera:

De acuerdo a los resultados obtenidos (Cuadro N° 3.1), la fruta fue congelada antes de proceder al pelado manual, la cáscara obtenida fue sometida a un proceso

de extracción a 4° C, para evitar la degradación del pigmento por factores externos, empleando como solvente de extracción una mezcla alcohol ácido, transcurrido el tiempo de extracción las fases fueron separadas, la solución coloreada fue sometida a una precipitación con acetato de plomo empleando hidróxido de sodio para ajustar el pH de precipitación, el precipitado obtenido fue disuelto empleando una solución de ácido en metanol.

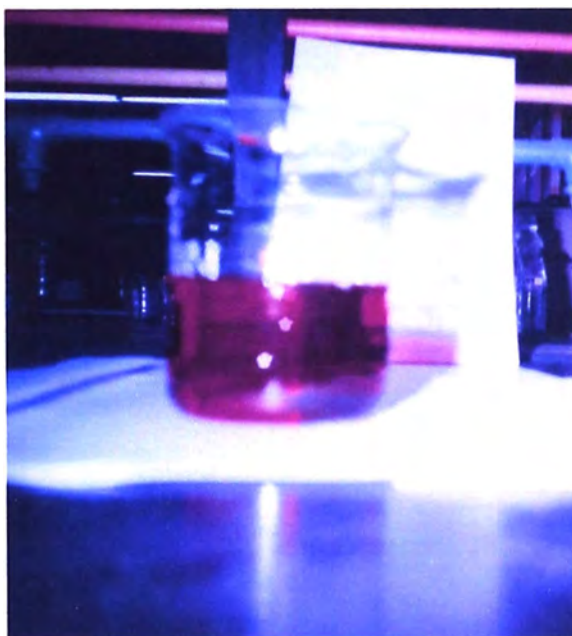
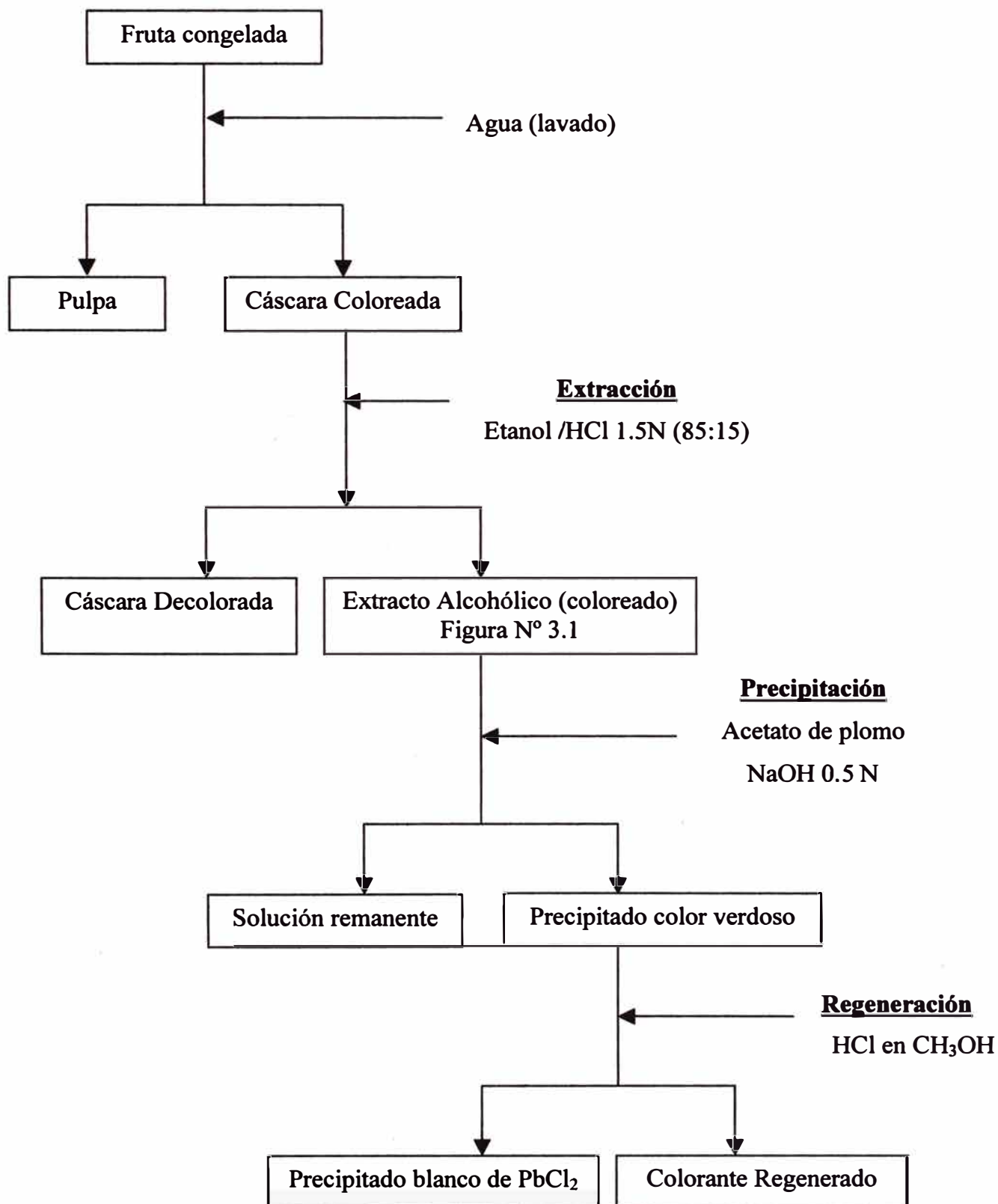


Figura N° 3.1 Extracto de camu-camu (solución coloreada)

Figura N° 3.2 Procedimiento seguido



3.2 Parámetros Recomendables para la Extracción del pigmento

Para realizar el estudio de extracción de antocianinas, se determinó la influencia de los siguientes parámetros: tiempo de extracción, número de extracciones, influencia del solvente, influencia del ácido, relación masa solvente; en la determinación de la cantidad de antocianinas extraídas, se empleó el método de pH diferencial descrito por Fuleki (1968b), las lecturas de absorbancia se realizaron con el espectrofotómetro UV Visible Shimadzu modelo 1601.

Los valores presentados corresponden al promedio de tres determinaciones realizadas.

3.2.1 Influencia del Solvente empleado en la extracción

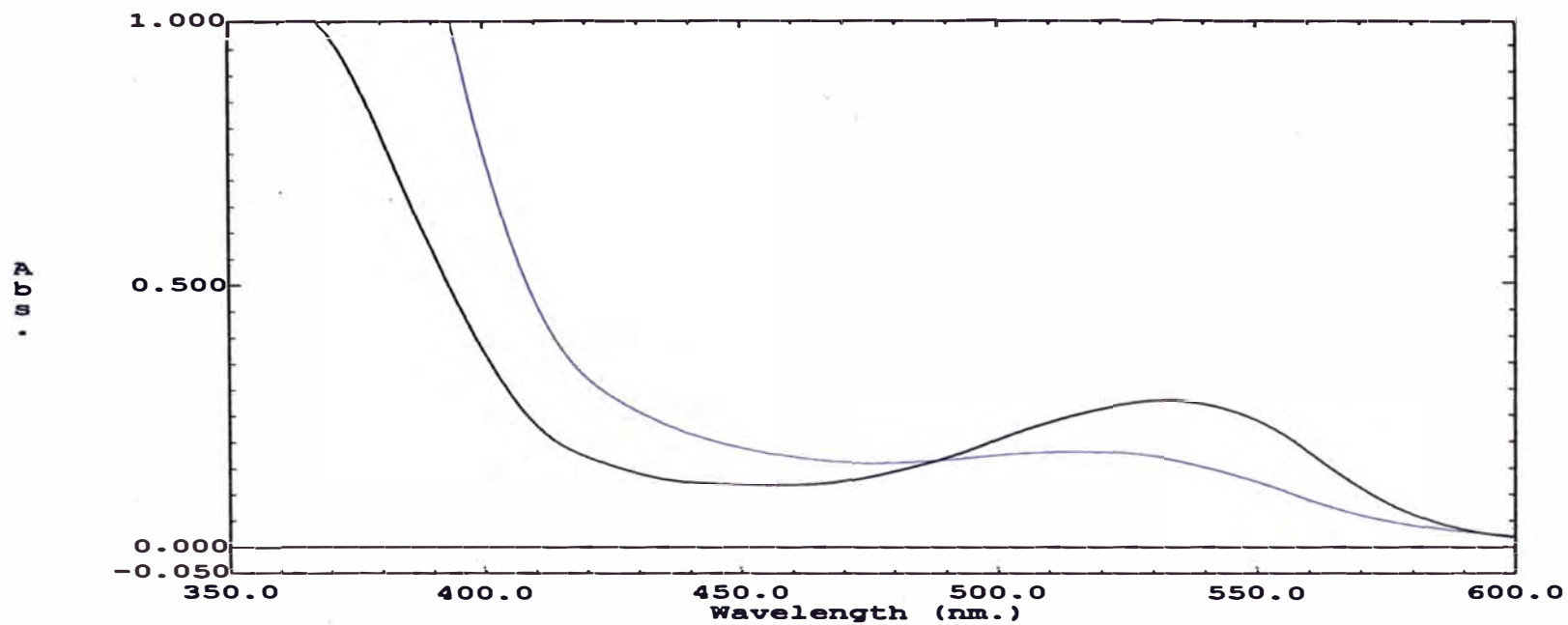
Se realizaron pruebas de extracción con diferentes solventes ácidos: Metanol + HCl, Etanol + HCl. Se observó al realizar una cromatografía de capa fina, que el extracto en Etanol + HCl extraía mayor cantidad pigmento rojo con respecto al extracto Metanol + HCl.

3.2.2 Influencia del Acido empleado en la extracción

Se evaluó el empleo de dos ácidos: Clorhídrico y Cítrico, de acuerdo a la recomendación dada por Fuleki (1968a); el solvente de extracción (alcohol/ácido (85:15)) debe tener un pH 1.0.

En la mezcla Etanol/HCl, se alcanzó un pH de 1.5, manteniéndose la proporción de mezcla fijada; en cambio, con el empleo de la mezcla Etanol/Ácido Cítrico, para alcanzar el pH deseado, la proporción de mezcla fue invertida y el pH final alcanzado fue de 3.5. Empleando ambas soluciones, como solventes de extracción, se obtuvo los espectros mostrados en la Figura N° 3.3

Figura N° 3.3 Influencia del ácido en la extracción



Etanol/HCl		Etanol/Ácido Cítrico	
λ (nm)	abs	λ (nm)	abs
532.8	0.278	513	0.181
360.6	1.053		

3.2.3 Influencia del Tiempo de Extracción

En este punto se evaluó el aumento en la cantidad de antocianinas extraídas por el solvente de extracción seleccionado (Etanol/HCl) en el tiempo. En el Cuadro N° 3.2, se presenta los resultados obtenidos. En dicho cuadro se puede observar que a medida que aumenta el tiempo de extracción, aumenta la cantidad de pigmento extraído.

Cuadro N° 3.2 Influencia del Tiempo de Extracción

Tiempo (hr)	AcyT (mg/mL)	% Rendimiento	Indice de degradación
2	6.3215	71.3645	1.1021
5	7.1888	81.1564	1.0285
7	8.1555	92.0700	1.1355
9	8.7954	99.2934	1.1381
12	8.8580	100.0000	1.1571

Condiciones de extracción

Solvente : Etanol/HCl 1.5 N

m/s : 1/7

Temperatura : Refrigeración (4°C)

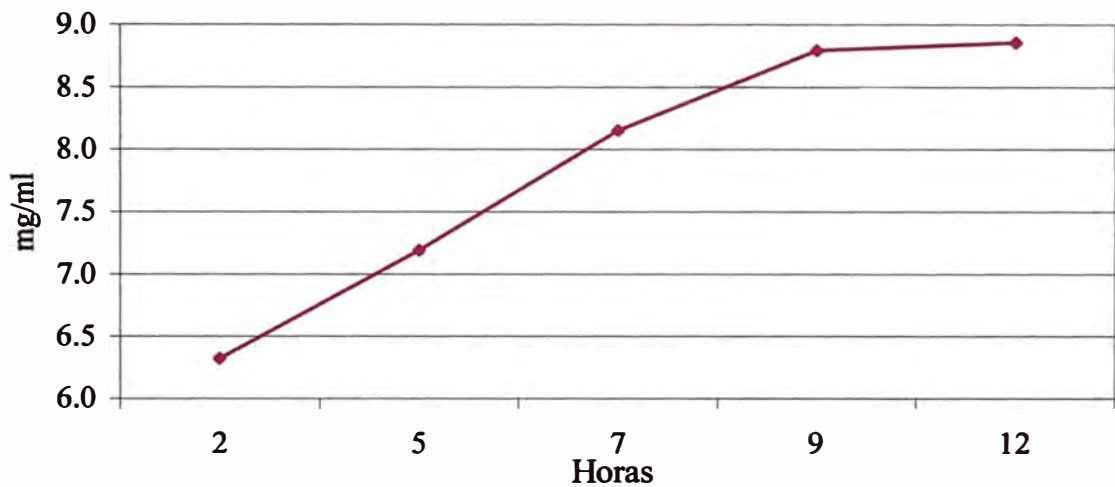
Extracción en una sola etapa

Tomando como 100% la extracción con 12 horas de contacto.

Asimismo se puede observar que el incremento entre 9 y 12 horas de contacto es de sólo 0.0626 mg/mL, y que tiempos mayores de extracción extraerían una menor cantidad. Además de acuerdo con Yúfera (1979), tiempos prolongados de extracción no son convenientes ya que extraen otros componentes como azúcares, pectinas, sales taninos, además de facilitar el crecimiento de microorganismos.

Adicionalmente se puede observar que el índice de degradación de antocianinas también se incrementa en el tiempo, es por ello que se recomienda como tiempo de extracción 12 horas para la realización de los siguientes ensayos.

Figura N° 3.4 Cantidad de antocianinas extraídas en el tiempo



3.2.4 Influencia de la relación Masa Solvente

Los resultados de estos ensayos se reportan en el Cuadro N° 3.3, así tenemos que a medida que se incrementa el volumen de solvente aumenta la extracción de antocianinas, respecto al índice de degradación, éste se incrementa ligeramente.

Cuadro N° 3.3 Influencia de la relación masa / solvente

m/s	AcyT (mg/mL)	Índice de degradación
1/5	4.4441	1.1367
1/7	4.7977	1.1359
1/10	5.5006	1.1459

Condiciones de extracción

Solvente : alcohol / ácido HCl 1.5 N

Temperatura : Refrigeración (4°C)

Tiempo de extracción : 12 horas

Extracción en una sola etapa

m/s : relación masa solvente

En vista que la cantidad de antocianinas aumenta con el volumen, no es posible llegar a determinar la mejor proporción materia prima / solvente. Por esta razón, se llevó a cabo otro ensayo bajo las mismas condiciones, sólo que esta vez se realizó una segunda etapa de extracción.

3.2.5 Influencia del Número de Etapas en la Extracción

Como es necesario agotar el pigmento rojo de la cáscara del camu-camu, se realizó un estudio para determinar la influencia del número de etapas en la extracción de antocianinas. En el Cuadro N° 3.4, se muestra el efecto de las extracciones sobre la cantidad de antocianinas.

Cuadro N° 3.4 Influencia del número de Etapas en la Extracción

m/s	Primera Extracción (mg/mL)	Segunda Extracción (mg /mL)	Extracción Total (mg/mL)
1/5	4.4441	1.1144	5.5585
1/7	4.7977	1.0923	5.8900
1/10	5.5006	1.0602	6.5609

Condiciones de extracción

Solvente : alcohol / ácido HCl 1.5 N

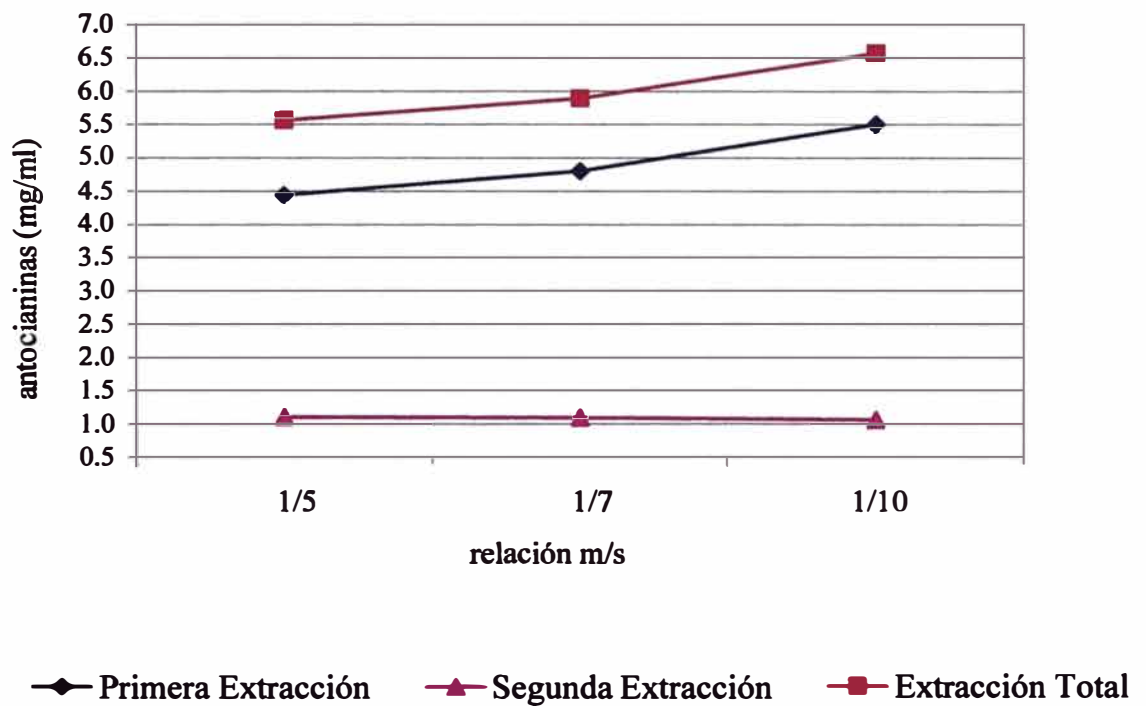
Temperatura : Refrigeración (4°C)

Tiempo de extracción : 12 horas

m/s : relación masa solvente

Se puede observar que la cantidad de antocianinas extraídas en una primera etapa representa casi el 80% del total extraído, además la extracción en una segunda etapa disminuye en un 75% con respecto a la primera extracción (Figura N° 3.5), es por ello que no se efectúa una tercera extracción, adicionalmente una tercera extracción arrastra residuos de cáscara suspendidos, las cuales deben ser eliminadas por centrifugación.

Figura N°3.5 Influencia del número de etapas en la extracción



3.3 Purificación de antocianinas

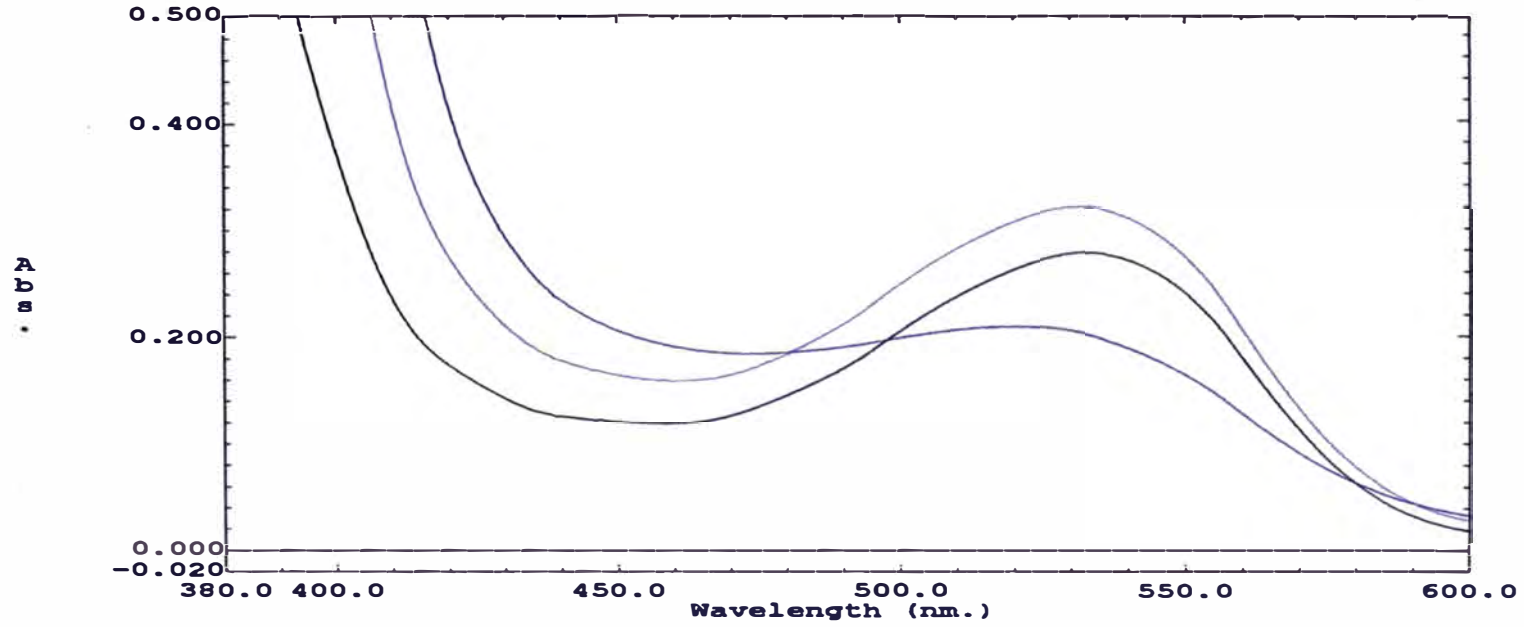
Con el fin de eliminar otros componentes de la planta es que se somete el extracto a una purificación preliminar, en el presente trabajo se realizó una destilación al vacío del extracto, precipitación con acetato de plomo, cromatografía con resinas de intercambio iónico y también una cromatografía con columna de celulosa, observándose que ésta retenía gran cantidad del pigmento rojo (Ver apéndice N° 01).




3.3.1 Concentración del extracto - Influencia de la Temperatura

Se realizaron pruebas de concentración por destilación al vacío, observándose la degradación del pigmento por la pérdida del color del mismo, de rojo a marrón con la formación de un precipitado. Esta inestabilidad del pigmento frente a la temperatura se incrementa ante la presencia del ácido ascórbico en la fruta (Goodwin 1976).

Este efecto se ve reflejado también en el desplazamiento que sufre los espectros en el máximo de absorción, tal como se observa en la Figura N° 3.6

Figura N° 3.6 Influencia de la Temperatura



abs	λ (nm)	abs
 muestra original sin calentar	532.8	0.386
 muestra calentada 15 min	531.8	0.320
 muestra calentada 30 min	520.2	0.209

3.3.2 Precipitación con acetato de plomo

Las antocianinas tienen la propiedad de formar sales de plomo insolubles; en esta reacción probablemente estén involucrados los grupos hidroxilos libres adyacentes a la molécula de antocianina (Fuleki y Francis, 1968 c.)

El extracto obtenido fue sometido a precipitación con 2 mL de una solución saturada de acetato de plomo por cada 25 mL de extracto (recomendado por Fuleki 1968c); las pruebas se realizaron a distintos valores de pH. La mezcla del extracto con el acetato de plomo tenía un pH de 1.8-2.0, los otros valores de pH (Cuadro N° 3.5) fueron obtenidos por la adición de Hidróxido de Sodio 0.5 N.

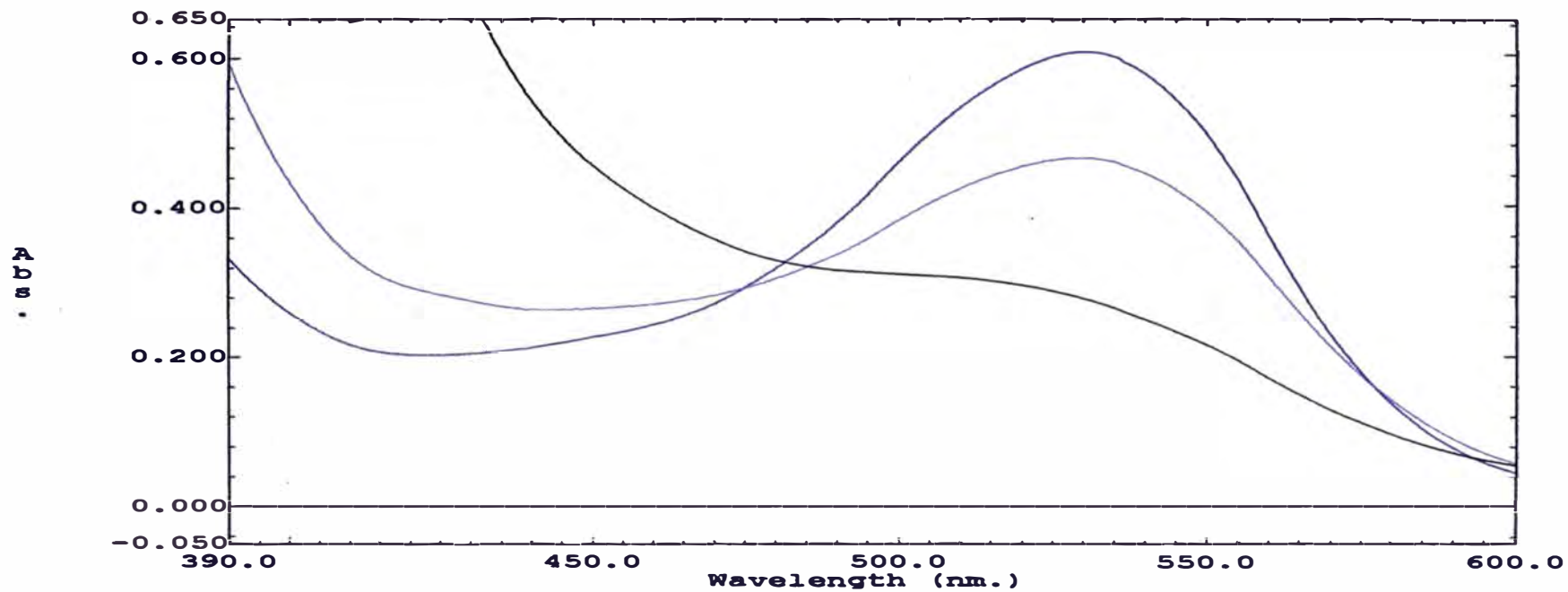
El precipitado de color verdoso obtenido, es reconvertido empleando una solución al 5% de HCl en metanol, también se puede optar por una cristalización del pigmento con éter (Kozo Hayashi, 1962), luego de la regeneración.

En el Cuadro N° 3.5, se presentan los resultados obtenidos. Se puede observar que la precipitación de antocianinas con acetato de plomo es dependiente del pH: así tenemos que la precipitación de antocianinas se presentan en el rango de pH 6.0 – 10.0 (Figura N° 3.7), fuera de estos valores no se observa presencia del máximo de absorción, a valores mayores se presenta degradación de las mismas, esto también puede observarse en la Figura N° 3.8.

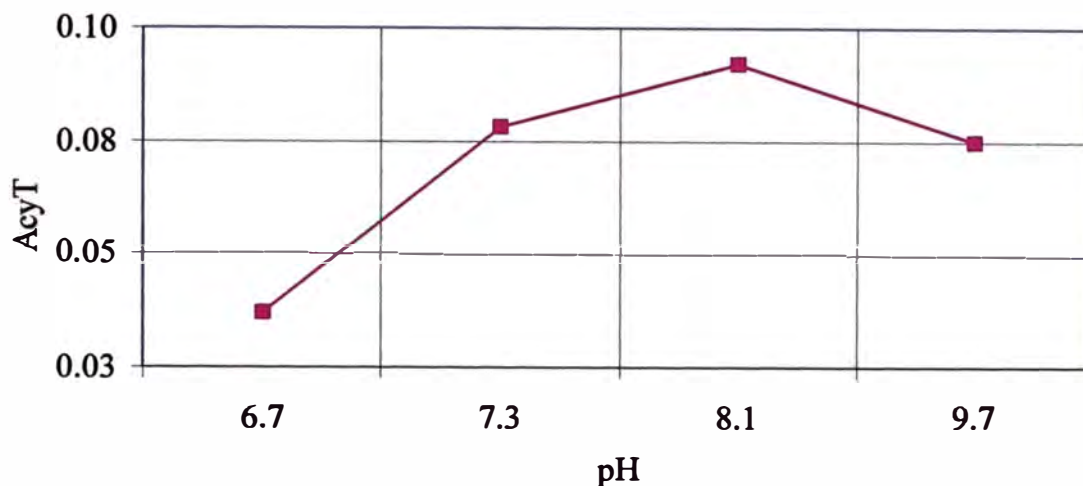
Cuadro N° 3.5 Influencia del pH en la precipitación con acetato de Plomo

PH	AcyT (mg/g de cáscara)	ID	% Rendimiento
6.7	0.03721	1.65	4.18
7.3	0.07836	1.43	8.81
8.1	0.09204	1.22	10.35
9.7	0.07496	1.46	8.43

Figura N° 3.7 Precipitación con acetato de plomo



	λ (nm)	abs
_____ precipitación a pH 5.5	-	-
_____ precipitación a pH 6.0	529	0.464
_____ precipitación a pH 7.0	529.8	0.605
_____ precipitación a pH 10.1	507	0.218

Figura N° 3.8 Influencia del pH en la precipitación con acetato de plomo

3.3.3 Cromatografía de intercambio iónico

Las antocianinas pueden ser sometidas a un proceso de purificación preliminar con resinas de intercambio iónico. Todos los flavonoides en solución acuosa son adsorbidos por las resinas, mientras que otros compuestos orgánicos solubles son eliminados por lavado con agua. Las antocianinas son separadas de la columna por medios de soluciones alcohólicas.

En el presente trabajo se emplea una resina catiónica fuerte, de acuerdo a los estudios reportados por Fuleki y Francis (1968c) para la purificación de antocianina de arándanos, ellos indicaron también el siguiente procedimiento de trabajo: la resina previamente es hidratada con agua, la cual es decantada ocasionalmente para eliminar las partículas pequeñas, una suficiente cantidad de resina es vertida en una columna de cromatografía hasta formar una columna de 15-18 cm, luego que la resina se ha asentado. 10 o 5 mL de CrJ fueron absorbidos en la columna. El azúcar fue lavada con 7 mL de agua destilada y las antocianinas fueron eluidas con 20-25 mL de una solución de HCl en metanol, que fue añadido a la columna en pequeños incrementos. La parte densa de la banda de antocianinas

eluidas con metanol fue colectada para la determinación de las antocianinas individuales por cromatografía.

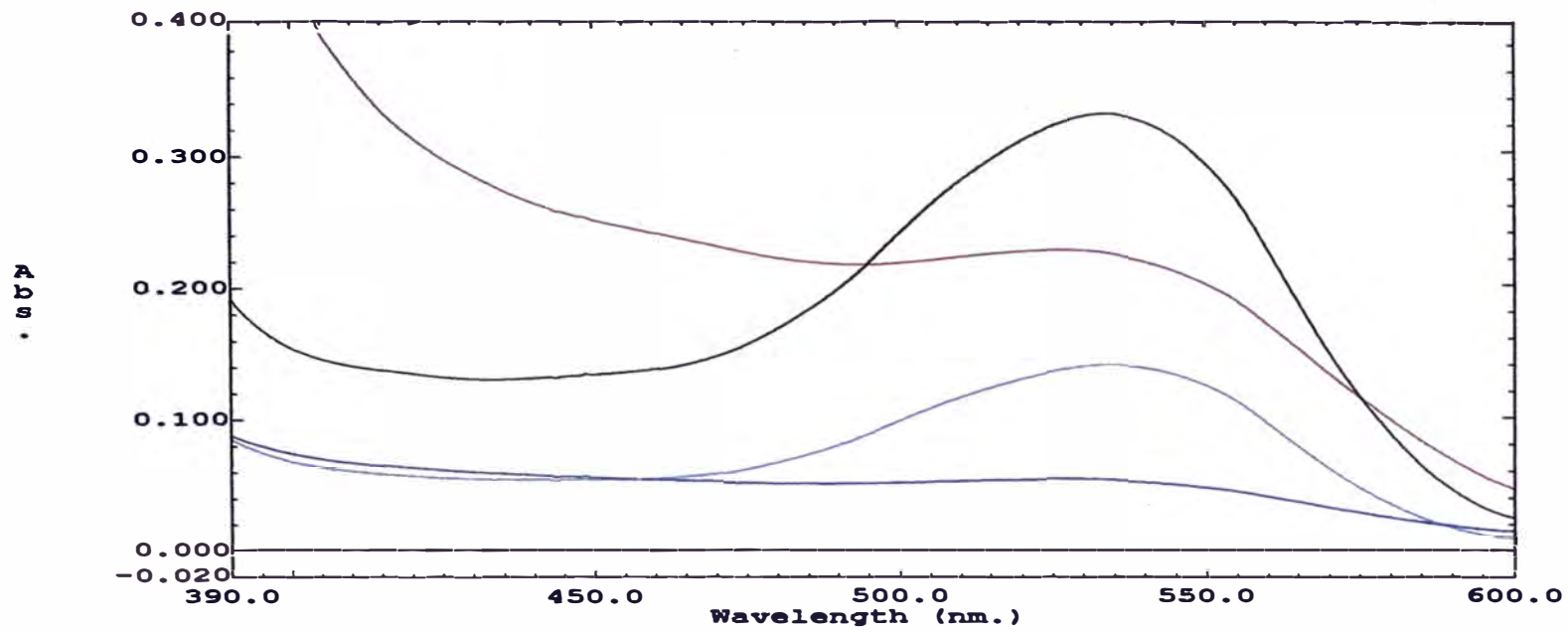
La cromatografía del presente estudio, fue realizada en una bureta de 10 mL (con un diámetro de 1.5 cm), como columna de cromatografía, la altura del empaque de resina fue de 23 cm. Después de añadir el extracto de antocianinas concentrado en el rotavapor (1 mL), se lavó con 5 mL de agua destilada, observándose primero el desplazamiento de una solución coloreada naranja-marrón, cuyo espectro UV no presentó señal de máxima absorción en el rango de las antocianinas, luego se procedió a la separación de las mismas, para ello se empleó una solución de Etanol/HCl (95:5) (25 mL), a una velocidad de 19 gotas/min en promedio, obteniéndose los espectros mostrados en la Figura N° 3.9, con los valores hallados se calculó la cantidad de antocianinas recuperadas (Cuadro N° 3.7).





Cuadro N° 3.7 Separación de antocianinas en la cromatografía de columna empleando resina de intercambio iónico (ácido fuerte)

	AcyT (mg/mL de extracto)	% de Recuperación
Muestra Original (**)	4.0755	100
Fracción 1	0.1910	4.6858
Fracción 2	0.2432	5.9680
Fracción 3	2.9013	71.1889

(**) muestra concentrada en rotavapor

Figura N° 3.9 Purificación preliminar empleando resinas de intercambio iónico



	λ (nm)	abs
	534.4	0.140
	533.4	0.330
	524.6	0.227
	-	-

3.4 Secado

Para secar el colorante purificado, se empleó como vehículo secante fécula de maíz y maltodextrina, obteniéndose en ambos casos un producto seco sin grumos.

Al disolver el colorante, secado en ambos vehículos, se observó una solución transparente y brillante con el empleo de maltodextrina, mientras que con fécula de maíz se obtenía una solución opaca. Es por ello que se decidió trabajar con maltodextrina como vehículo secante.



Figura N° 3.9

La Figura N° 3.9 muestra el colorante rojo extraído de la cáscara del camu-camu, el colorante regenerado; así como el colorante seco

3.5 Caracterización

3.5.1 Contenido de Maltodextrina

Se determinó el contenido de maltodextrina empleando como método la diferencia de pesadas (Less, R 1982), obteniéndose el siguiente resultado: para secar un mL de colorante regenerado, es necesario emplear 1.13 g de maltodextrina, el producto aún húmedo tiene la apariencia de una jalea, el producto seco es soluble en agua tibia, dando una solución coloreada transparente.

3.5.2 Contenido de Humedad

Se determinó el contenido de humedad (Less, R 1982), observándose que el producto tiene un 4.82 % de humedad.

3.5.3 Determinación de Plomo Residual

Para la determinación de la cantidad de plomo retenida se empleó el método de la AOAC 26.066 (A.O.A.C. 1975), para ello se usó el equipo de absorción atómica, Atomic Absorption Flama Emisión Spectrophotometer Shimadzu Corporation, modelo AA 6701 F. De los resultados obtenidos se sabe que luego de la regeneración, el colorante retiene 100 ppm de plomo, después de pasar el extracto por la columna de intercambio el contenido de plomo baja a 75 ppm.

3.5.4 Desplazamientos batocrómicos e hipsocrómicos por el uso de reactivos de diagnóstico

El uso de determinados reactivos nos permitió obtener información acerca del desplazamiento de la antocianina, debido a los diferentes sustituyentes, presentes en el anillo B. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro N° 3.6 (Lock de Ugaz,1997).

Cuadro N° 3.6 Resultados del uso de reactivos de desplazamiento

Reactivos	λ máximo de absorción	Tipo de desplazamiento
Etanol	535	
Metanol	527.5	
Metóxido de Sodio	596.2	Batocrómico
Tricloruro de Aluminio ^a	526	Hipsocrómico
Tricloruro de Aluminio-Ácido Clorhídrico	524	Hipsocrómico
Acetato de Sodio ^a	588	Batocrómico
Acetato de Sodio ^a -Acido Bórico	562.4	Batocrómico

^a Pruebas realizadas con reactivos hidratados

El barrido espectral se realizó en la región visible en medio metanol HCl. Los resultados experimentales indican que la antocianina en estudio presenta grupos hidroxilos en el anillo B, en posición o-hidroxilo y grupos sensible a los álcalis. De los datos obtenidos y la bibliografía presentada, podemos afirmar que se trata de la delfinidina-3 monoglucósido.

3.6 Aplicaciones

El colorante de camu-camu obtenido puede ser empleado en la industria de alimentos y en la industria cosmética y farmacéutica.

En la industria de alimentos se usan principalmente en los condimentos, bebidas líquidas y en polvo, galletería, panadería y repostería, heladería y derivados lácteos, dulces, conservas y gelatinas, así como para alimentos para animales.

Los colorantes deben ser almacenados en lugares secos y oscuros a temperatura ambiente.

Asimismo, el consumo regular de alimentos naturalmente altos en antioxidantes (frutas, vegetales, granos integrales, nueces, legumbres y condimentos a base de hierbas) está estrechamente asociado con sustanciales beneficios de salud. Las personas que consumen cantidades altas o modestas de estos alimentos, ingieren niveles sustanciales de una variedad de fitoquímicos activos y por lo tanto tienen un riesgo menor de contraer cáncer y enfermedades del corazón (Andrews University Nutrition Department, 2002).

El jugo de uvas rojas y el vino tinto contienen un nivel significativo de flavonoides y pigmentos rojos de antocianina, que actúan como antioxidantes, es decir, sustancias protectoras contra los síntomas del envejecimiento, disminuirían la aparición de infecciones del tracto urinario, protegerían al colesterol de la oxidación, reducirían los niveles de lípidos en la sangre e inhibirían la formación de coágulos en la sangre, proveyendo de esa manera protección contra las enfermedades del corazón (Andrews University Nutrition Department 2002). Además tendrían un efecto protector contra el cáncer: modificando la actividad de algunas enzimas, perturbarían la actividad de los cancerígenos y facilitarían su eliminación, también podrían impedir el crecimiento de las células cancerígenas. Contra las enfermedades cardiovasculares: neutralizando los radicales libres y

aumentando la resistencia del LDL-colesterol al oxidarse. En la circulación sanguínea aumentan la resistencia de los vasos sanguíneos y actuarían sobre las plaquetas y la fluidez de la sangre (Dr. Max Tafur, Fitoquímicos).

El uso regular de pasas de uva (tres o cuatro onzas al día por dos meses), ha demostrado ser capaz de disminuir el nivel de colesterol en la sangre y el colesterol LDL, mejorar la función de evacuación y posiblemente disminuir el riesgo de sufrir cáncer de colon (Andrews University Nutrition Department, 2002).

Se ha informado también, que en la Facultad de Medicina de la Universidad de Nagoya, Japón, un equipo de investigadores, encabezados por el profesor Tomoyuqui Shirai, han establecido que el pigmento del Maíz Morado (Antocianina) evita la aparición del Cáncer al Intestino Grueso. 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 pescado asado, conjuntamente con un 5% del pigmento del Maíz Morado (Ver apéndice N° 02).

El resultado no pudo ser más promisorio a las 20 ratas alimentadas solo con la sustancia cancerígena, 17 (el 85%) desarrollaron cáncer del intestino grueso frente a 8 ratas (40%) de las que tomaron el pigmento.

La Agencia de Investigación en Cáncer de Japón, resalta que la capacidad de las sustancias cancerígenas contenidas en las zonas quemadas de los alimentos sería suficiente para causar cáncer en las personas. (Revista Caretas Edición N° 1685 del 29 de agosto de 2001).

Los estudios del Dr James Joseph, (publicados en la revista Journal of Neuroscience en setiembre de 1999) se iniciaron con un grupo de ratas "Fisher" de

su laboratorio. Las ratas tenían edades equivalentes a un humano de 60 a 65 años y fueron alimentadas diariamente con extracto de la baya "Blueberry" (*Vaccinium corybosum*), en una dosis equivalente a media taza para los humanos. Otro grupo de ratas, fue alimentado con extracto de espinacas, vitamina E o extracto de fresas.

Después de ocho semanas, en que las ratas tenían una edad equivalente a un humano de 70 a 75 años, las ratas fueron sujeto de diferentes exámenes, para evaluar la memoria y sus funciones motoras, como caminar en una varilla estrecha, o permanecer caminando en una banda en movimiento y otras acciones para evaluar la memoria.

Solo las ratas que fueron alimentadas con la baya blueberry, mostraron una mejoría dramática en el balance, funciones motoras y de memoria. Lo que los investigadores descubrieron con estas pruebas, es que las ratas mostraron una "reversión" de la disfunción de las actividades motoras, balance y coordinación que viene con el envejecimiento. Los grupos de ratas que fueron alimentadas con los otros alimentos, no mostraron una mejoría significativa. Y con este estudio, se demostró por primera vez, que una alimentación cargada con estos compuestos fenólicos, revirtió el daño causado por el envejecimiento.

4.1.2 Precipitación

De acuerdo a la relación propuesta por Fuleki (1968c), se empleó 2 mL de solución de acetato de plomo saturada por cada 25 mL de extracto.

Para alcanzar pH 8.0 (pH óptimo), se empleó NaOH 0.5 N, de acuerdo a las pruebas realizadas se necesita un promedio de 6mL de Hidróxido de Sodio por cada 25 mL de extracto, entonces tenemos:

Acetato de Plomo (sat)	: 0.448 L ó 448 mL
Hidroxido de Sodio 0.5 N	: 1.344 L ó 1344 mL

Para el Acetato de Plomo empleado:

Solubilidad 19.7/100 mL (Manual del Ingeniero Químico –Perry Tomo I pag. 3-21)

Entonces se necesita 88.25 g. de acetato de plomo

Para el Hidróxido de Sodio:

Para obtener una solución 0.5 N de NaOH, se emplea 26.88 g de soda

El precipitado es separado de la solución por centrifugación, obteniéndose 7.392 L de solución remanente, aquí se considerara un 10% como pérdida por manipulación, entonces el volumen final obtenido será de 6.65 L.

4.1.3 Regeneración

Para la regeneración del colorante, se emplea una solución al 5% de HCl en Metanol (Fuleki 1968c), el volumen empleado en la regeneración fue aproximadamente 7% del volumen recuperado luego de la extracción, es decir que

por 5.6 L de extracto se necesita 392 mL de solvente de regeneración (19.6 mL de HCl 8.0 N en 372.4 mL de metanol), obteniéndose finalmente 352.8 mL de colorante regenerado, con un contenido de antocianina de 21 mg/g cáscara y con la formación de un precipitado blanco de cloruro de plomo, el cual es separado por centrifugación.

4.1.4 Secado

Para el secado se empleó como vehículo maltodextrina. De acuerdo a las pruebas realizadas, se determinó que se necesita 1.13g para secar 1 mL (para adquirir la apariencia de jalea) de colorante regenerado, para los 352.8 mL se necesitaran 400 g de maltodextrina aproximadamente.

4.1.5 Recuperación del alcohol etílico

Se empleó un equipo de rectificación de alcoholes, determinándose que el volumen de alcohol recuperado es el 50% del volumen de la solución remanente.

Así tenemos:

Volumen de solución remanente	: 6.65 L
Volumen de alcohol	: 4.283 L
Volumen de Ácido Clorhídrico	: 0.755 L
Volumen de Acetato de Sodio	: 0.403 L
Volumen de Hidróxido de sodio	: 1.209 L
 Volumen recuperado (alcohol)	 : 3.325 L

Lo que significa que se recupera un 77.6% del alcohol etílico (92%) empleado en la extracción y con un grado alcohólico de 84%.

4.2 Balance de Energía

Haciendo un balance de energía en la recuperación de alcohol tenemos:

Un volumen de 6.65 L, de solución remanente, compuesta por 4283 mL de alcohol y 2367 mL de agua, con un peso de 5.75 Kg.

Peso del agua = 2367 g = 2.37 Kg

Peso del alcohol = 3383 g = 3.38 Kg ($\rho_{\text{alcohol etílico}} = 0.79 \text{ g/mL}$)

$$Q_{\text{sensible}} = q_{\text{H}_2\text{O}} + q_{\text{alcohol}} \dots\dots\dots (A)$$

$T_1 = 78 \text{ }^\circ\text{C}$ y $T_2 = 20 \text{ }^\circ\text{C}$

Calor absorbido por el H_2O :

$$q_a = m * C_p * \Delta T \dots\dots\dots(B)$$

Donde:

a : agua o alcohol

C_p : Calor específico (cal/g $^\circ\text{C}$), para el agua es igual a 1, para el alcohol es 0.76.

$\Delta T = 58 \text{ }^\circ\text{C}$

Entonces en B:

- Para el agua tenemos:

$$Q_{\text{H}_2\text{O}} = 137286 \text{ cal} = 137.286 \text{ Kcal.}$$

- Para el alcohol tenemos:

$$Q_{\text{alcohol}} = 149122\text{cal} = 149.123 \text{ Kcal.}$$

En A:

$$Q_{\text{sensible}} = 286.41 \text{ Kcal.}$$

CAPITULO 5 CONCLUSIONES Y OBSERVACIONES

1. Este proceso es aplicado a una línea auxiliar de producción de pulpa de camu-camu, con fruta que ha llegado a pigmentar.
2. Es recomendable eliminar la mayor cantidad de residuo de fruta de la cáscara para evitar la degradación del pigmento, así como también realizar esta operación con agua helada o fruta congelada, porque reduce la pérdida del pigmento durante el lavado.
3. El rendimiento de cáscara congelada / fruta es del 14%.
4. Es recomendable el empleo de ácido clorhídrico como solvente de extracción.
5. Las condiciones recomendadas para la extracción de antocianinas son las siguientes:

Solvente de Extracción	: Etanol + HCl 1.5 N pH 1.5
Materia prima / solvente (m/s)	: 1/10
Temperatura	: Refrigeración (4° C)
Tiempo de Extracción	: 12 horas
Etapas de Extracción	: 2 etapas

6. Por las características propias del fruto, en las condiciones existentes, no es recomendable el empleo de una destilación al vacío para concentrar el extracto.
7. El rango de precipitación de las antocianinas del camu-camu, se encuentra en el rango de pH de 6.0 a 10.0.

8. La precipitación con acetato de plomo recomendable ocurre a pH 8.1, dicha precipitación permite una recuperación del 10.35%
9. Las condiciones recomendadas para dicha precipitación son las siguientes:
- | | |
|---------------------------------------|-----------|
| Extracto | : 1 mL |
| Solución de acetato de plomo saturada | : 12.5 mL |
| Hidróxido de Sodio 0.5 N | : 3 mL |
10. No es recomendable el empleo de celulosa, como soporte de cromatografía, debido a la retención de colorante que presenta.
11. Una resina catiónica fuerte, como soporte, permite una recuperación del 71.18 % de las antocianinas pasadas a la columna de cromatografía.
12. El empleo de una columna de cromatografía, así como el lavado (una vez) del producto con agua, reduce el contenido de plomo en un 25%.
13. Se recomienda emplear acetato de plomo básico, con lo cual se disminuiría el consumo acetato de plomo en un 33%.
14. La relación de secado es 1.13 g de maltodextrina por mL de colorante regenerado.

CAPITULO 6 BIBLIOGRAFÍA

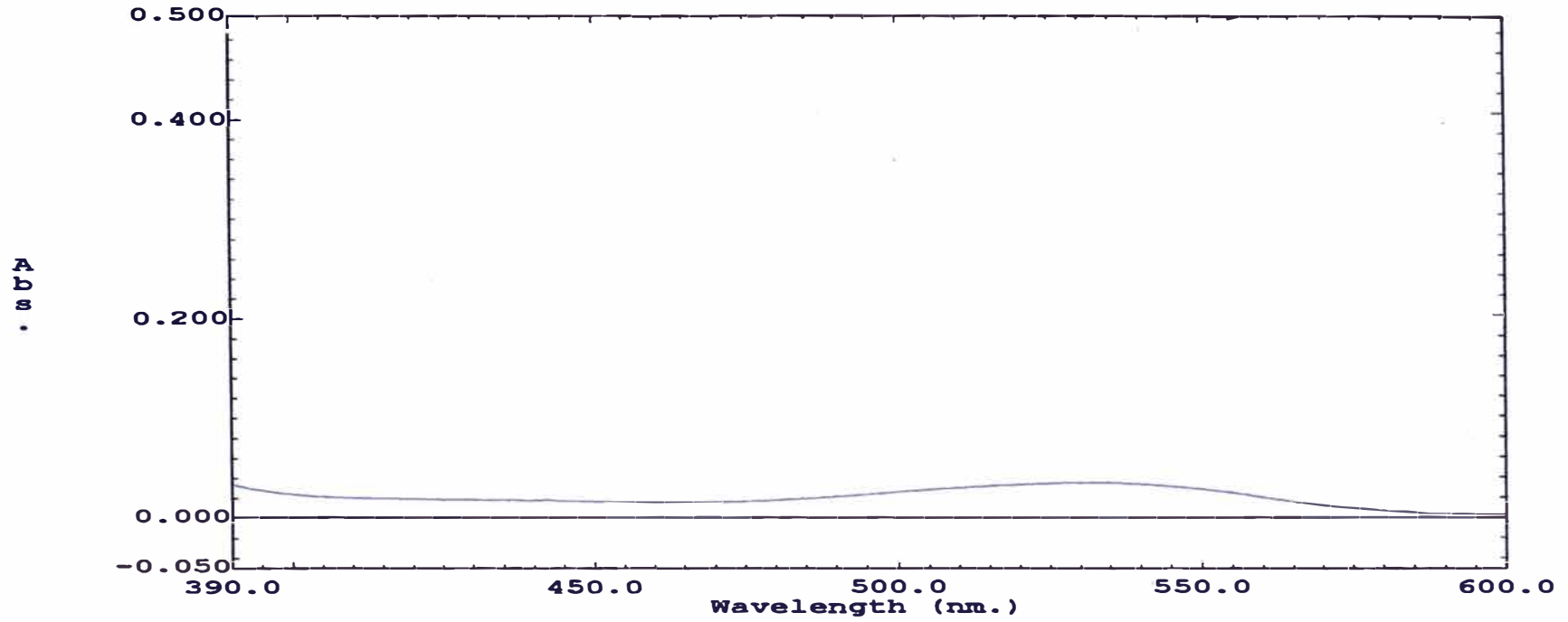
1. Bate-Smith E.C., (1954), Nature 161,735 (1948); Biochem. J. 58,122.
2. Calzada, J. 1980: 143 frutales nativos. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. Perú. 320 p.
3. Chávez, W. 1993: Camu-camu. p. 139-146. En: C.W. Clay y C.R. Clement. Selected species and strategies to enhance income generation from Amazonian forest. FO: Misc./93/6. Working Paper. FAO. Rome.
4. Fennema O.R, (19859), Introducción a la ciencia de los alimentos. Editorial Reverte.
5. Fuleki Tibor y Francis F.J. 1968a Quantitative Methods for Anthocyanins. Extraction and Determination of Total Anthocyanin in Cranberries. J. Food Sciences, 33:72.
6. Fuleki Tibor y Francis F.J. 1968b Quantitative Methods for Anthocyanins. Determination of Total Anthocyanin and Degradation Index for Cranberry Juice. J. Food Sciences, 33:78.
7. Fuleki Tibor y Francis F.J. 1968c Quantitative Methods for Anthocyanins. Purification of Cranberry Anthocyanins. J. Food Sciences, 33:266.
8. Geissman T.A., Jorgensen EC and Harbone J.B., (1953) Chem & Ind (London) 1389.
9. Goodwin T.W., (1976) Chemistry and Biochemistry of Plant Pigment Vol. 1. Capítulo 8.

10. Goodwin T.W., (1976) *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigment Vol. 1. Capítulo 17, páginas 812-829.*
11. Guillermo A. Iacobucci y James G. Sweeny, (1983), *Tetrahedron Vol 39, N° 19 páginas 3005-3038*
12. Harbone J.B., and Sherralt H.S.A., (1957), *Biochem. J. 65,23.*
13. Jurd Leonard (1962), *The Chemistry of Flavonoid Compounds – Capítulo 5 Spectral Properties of Flavonoid Compounds. (T.A.Geissman, ed.). Pergamon Press. N.Y. and Oxford, pág. 107-155.*
14. Kozo Hayashi (1962), *The Chemistry of Flavonoid Compounds – capítulo 9 The Anthocyanins. (T.A.Geissman, ed.). Pergamon Press. N.Y. and Oxford, pág. 248-283.*
15. Less, R 1982, *Manual de análisis de alimentos. 2ª Edición Editorial Acribia Zaragoza España.*
16. Lock de Ugaz, Olga, (1997), *Colorantes Naturales, PUCP- Editorial Fondo Educativo Lima.*
17. Lock de Ugaz, Olga, (1997) *Investigación Fitoquímica, PUCP- Editorial Fondo Educativo, Lima.*
18. Mabry, T.J.; Markaham (1983). *Compuestos Aromáticos.*
19. Mendoza, O., C. Picón, J. Gonzáles, et al. 1989. *Informe de la expedición de recolección de germoplasma de camu-camu (Myrciaria dubia) en la Amazonía peruana. Informe Técnico N° 11. Programa de Investigación en Cultivos Tropicales. INIA. Lima. 19 p.*

20. Pollotron, (1984), Inducción de color en manzanas Fruticultura Moderna.
21. Timberlake, C., F. and Bridle, P., (1968), J. Sci. Food Agric., 18, 473.
22. Villachica L, Hugo Consultor del Proyecto RLA/92/G 32 PNUD/GEF El cultivo del camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. Mc Vaugh) en la Amazonía peruana. Tratado de Cooperación Amazónica.
23. Yúfera EP,(1979) Química Agrícola III. Alimentos. Editorial Alambra 1º Edición p 320 España.
24. A.O.A.C. 1975 Official methods of analysis of the Association Official Agricultural Chemist. Ed. Board 12º edición U.S.A.

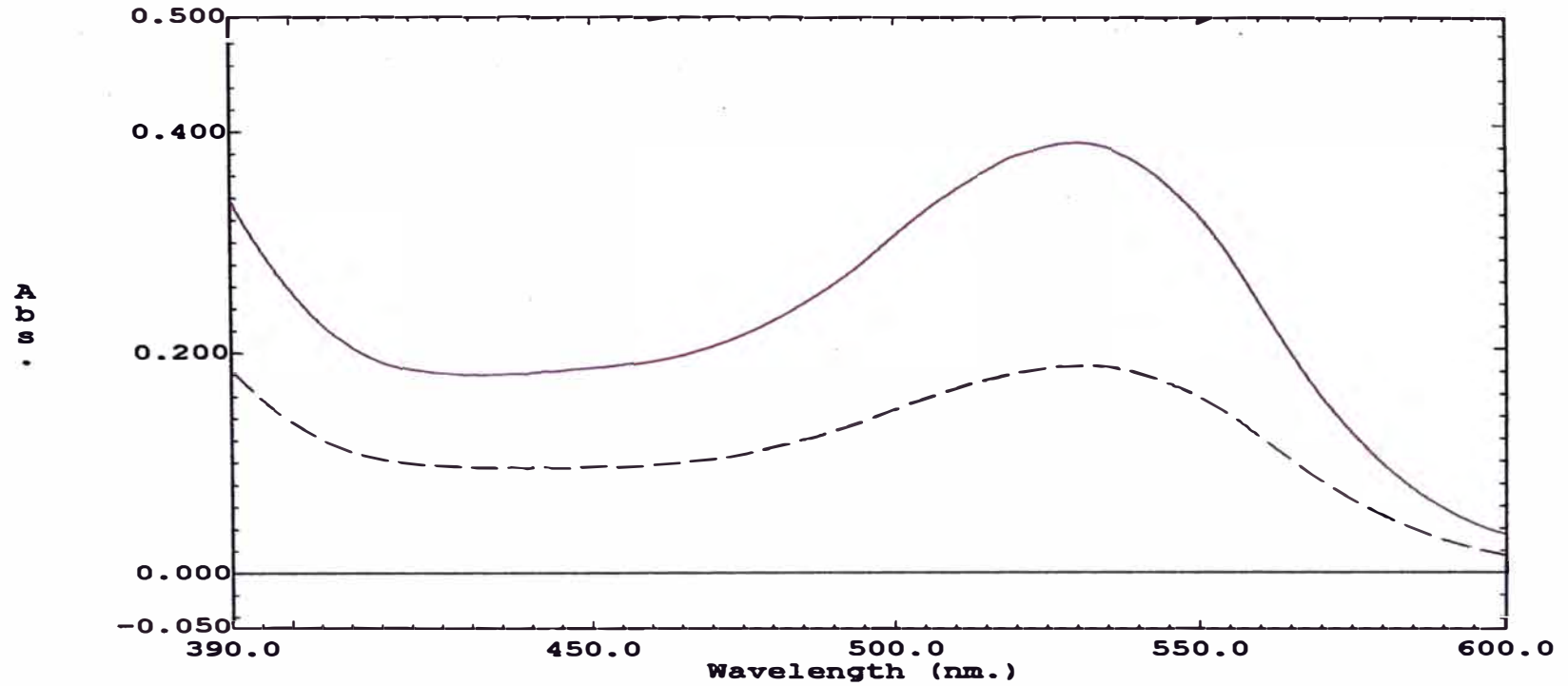
Apéndice N° 01 Purificación preliminar de antocianinas (espectros)

Purificación Preliminar de antocianinas empleando resina de intercambio



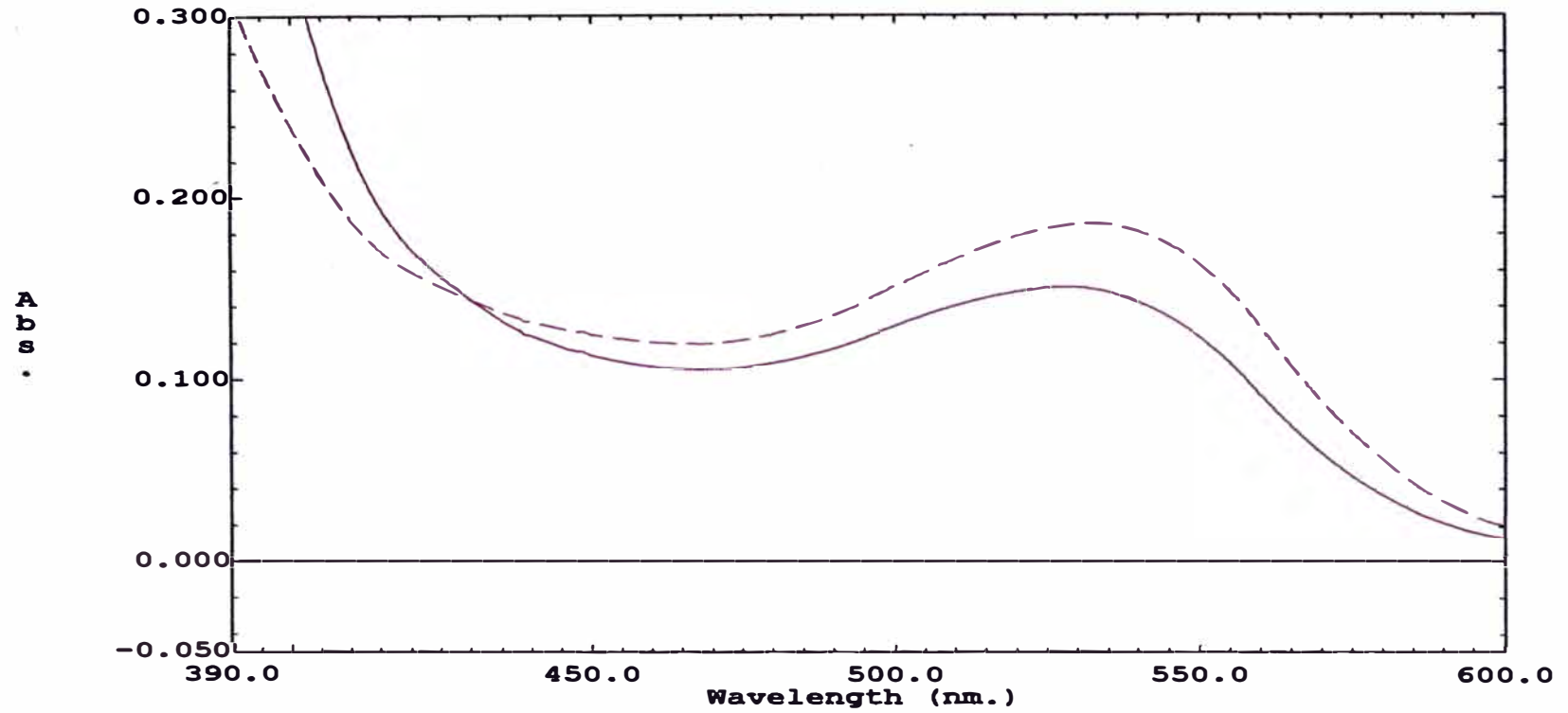
	λ (nm)	abs
—	530	0.178
—	529	0.034

Purificación Preliminar de antocianinas empleando resina de intercambio



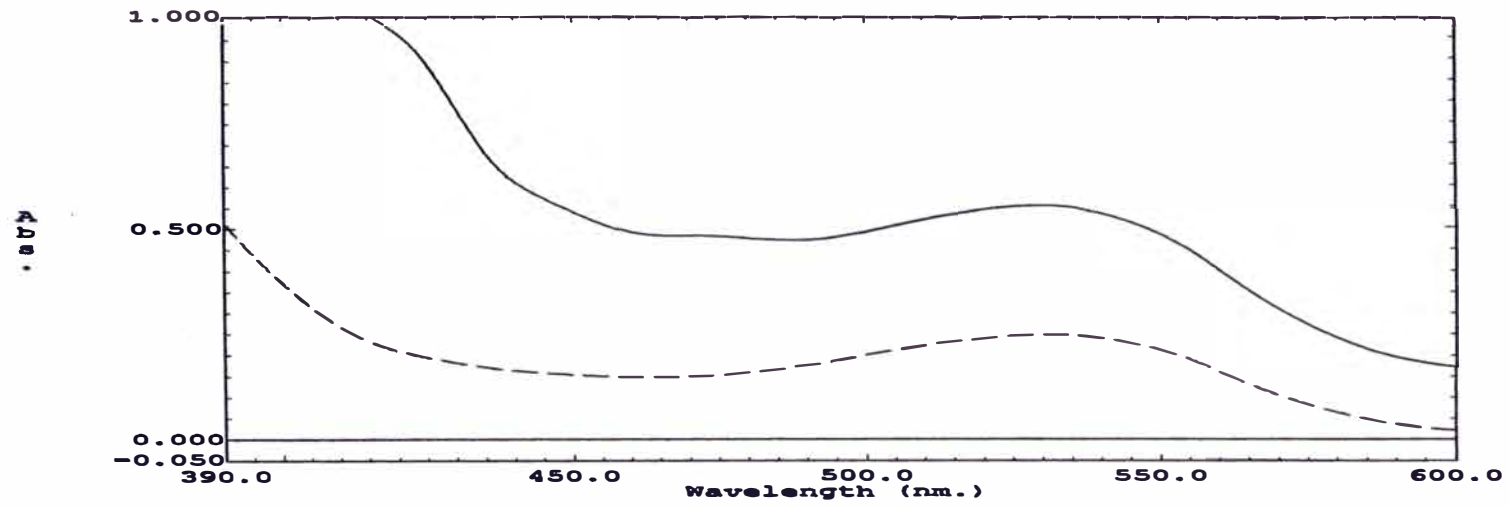
	λ (nm)	abs
—	529.6	0.386
- - - - -	530.2	0.186

Purificación Preliminar de antocianinas empleando celulosa



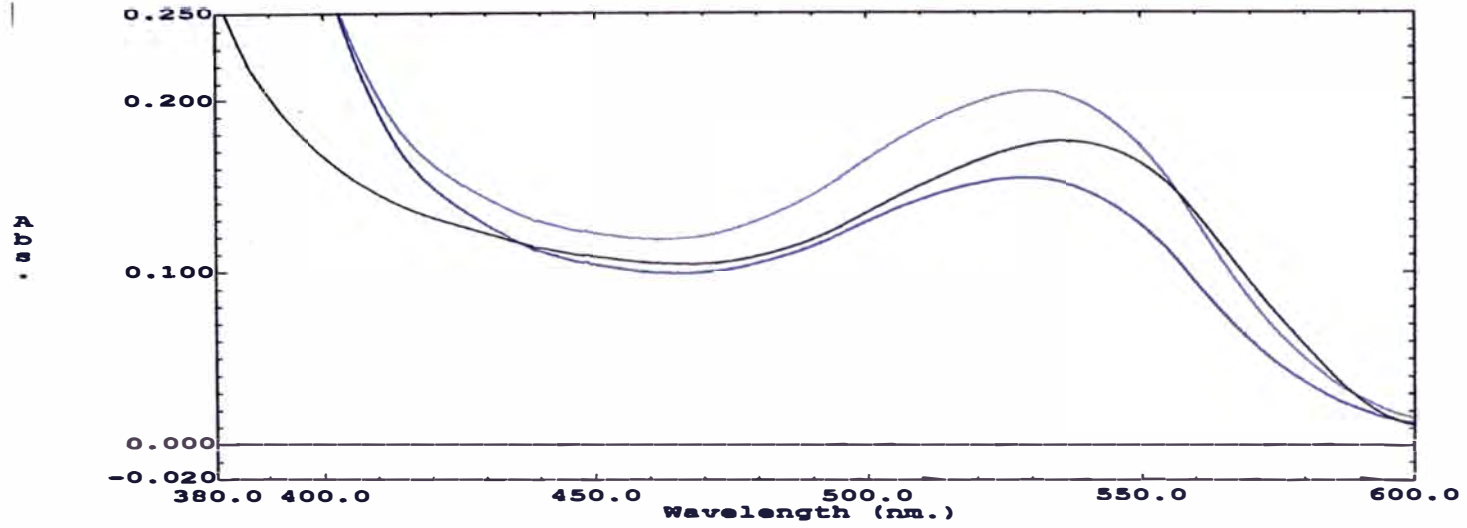
	λ (nm)	abs
-----	531.6	0.185
————	527	0.150

Purificación Preliminar de antocianinas empleando celulosa



	λ (nm)	abs
—	529.8	0.553
- - - -	530	0.248

Purificación Preliminar de antocianinas empleando celulosa



abs	λ (nm)	abs
—	535.8	0.176
—	530	0.204
—	527.8	0.154

Apéndice N° 02 Propiedades de las antocianinas

ARTICULO I Caretas Edición N° 1685 del 29 de agosto de 2001

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 cáncer

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.

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.

El cáncer colon rectal es el segundo más letal de todos los cánceres. El que ataca el intestino grueso (colon) es más frecuente en mujeres, mientras que el de recto lo es en hombres.

Cuando el mal no puede ser controlado con cirugía, se aplica quimioterapia, pero las posibilidades de curación son escasas. La cirugía disminuye algunos síntomas pero la supervivencia es aproximadamente de 7 meses.

Como medidas preventivas se recomiendan comidas ricas en fibra y bajas en proteína animal, grasas e hidratos de carbono refinados. También se aconseja consumir calcio, vitamina D y vegetales como el repollo, coles de Bruselas y brócoli para disminuir los riesgos.

En esta lista se podría ya incluir al maíz morado cuyas propiedades como regulador de la presión alta es reconocido por nuestra farmacopea natural. (**Ruth Lozada**).

Presentación

Chicha Morada Extracto Concentrado 20X, Aséptico.

Maíz Morado Extracto Concentrado 20X, Aséptico.

Por cada unidad de Extracto se obtiene 20 unidades de Chicha Morada o de Maíz Morado.

Presentaciones de las Bolsas Asépticas:

Cilindros Metálicos de 55 galones

Cajas de 25 Kg

Cajas de 20 Kg (08 Bolsas de 2.5 Kg cada una)

ARTICULO II Pigmentos pueden proteger el maíz contra los insectos

Por Jan Suszkiw, 11 de agosto 2003

Proteger las cosechas de maíz con un ingrediente de las flores es el foco de Eric Johnson, uno de 20 científicos del Servicio de Investigación Agrícola (ARS) que discutirán sus obras y sus últimos hallazgos durante la reunión anual de la Sociedad Fitoquímica de América del Norte (PSNA por sus siglas en inglés) el 9-13 de agosto en Peoria, Illinois.

Johnson, un investigador en el Centro Nacional para la Investigación de Utilización Agrícola (NCAUR por sus siglas en inglés) en Peoria, está conduciendo estudios para desarrollar plantas de maíz que tienen los genes para hacer pigmentos llamados antocianinas. Dependiendo de las condiciones del pH, estos pigmentos les dan los colores rojo y morado a muchas flores, frutas (arándanos, por ejemplo) y vegetales.

Sin embargo, el interés de Johnson acerca de las antocianinas no es solamente estético. Al contrario, él está investigando los hallazgos de estudios anteriores, que sugieren que cantidades grandes de antocianinas pueden impedir algunos insectos de alimentarse. Específicamente, Johnson se concentró en el gusano cogollero ('fall armyworm') y el gusano ejotero ('corn earworm'). En forma de oruga, el gusano ejotero les cuesta a los cultivadores de maíz 1 mil millones de dólares anualmente en pérdidas de cosechas y gastos de productos químicos.

En la Unidad de Investigación de Bioprotección de Cosechas de NCAUR, Johnson está alimentando las orugas con una dieta que las beneficiaría normalmente aparte de un ingrediente secreto: una dosis de 1.000 partes por millón de delphinidin, una de las varias antocianinas que son disponibles comercialmente.

Durante un simposio en la reunión de PSNA el 11 de agosto, Johnson reportará sus hallazgos hasta la fecha. Estos incluyen una reducción de 60 por ciento en el peso del gusano cogollero comparado con el grupo testigo. Ahora se usa el insecticida químico para combatir el gusano cogollero así como el gusano ejotero. Pero eventualmente, las investigaciones de Johnson podrían resultar en nuevos híbridos de maíz que producen antocianina en su pelusa. Estos pigmentos de antocianina proveerán una defensa incorporada contra las orugas antes de que ellas se alimenten en los granos del maíz.

El entomólogo del ARS Pat Dowd, el científico principal en las investigaciones, tiene un interés especial en prevenir que las plagas diseminen los hongos que a veces pueden contaminar los granos con toxinas tales como aflatoxina y fumonisinas, que son dañinos a la salud de seres humanos y el ganado.

ARS es la agencia principal de investigaciones científicas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

ARTICULO III Antocianinas en Pulpa de Café del Cultivar Bourbon Rojo**C. A. BARBOZA¹, J. R. RAMIREZ-MARTINEZ²**¹Estación Experimental Agrícola, FONAIAP, Bramón, Venezuela²Departamento de Bioquímica, UNET, San Cristóbal, Venezuela**SUMMARY**

Anthocyanins are the pigments responsible for the colour of the coffee red cherries. They are made of an aglycon (anthocyanidin) substituted with one or more sugars. The aglycon of the Red Bourbon anthocyanins was found to be cyanidin, whereas the substituting sugar was glucose. The two anthocyanins detected in coffee pulp of the cultivar Red Bourbon were cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-diglucoside.

RESUMEN

Las antocianinas son los pigmentos responsables por el color de las cerezas de café rojas. Ellas consisten de un aglicón (antocianidina) sustituido con uno ó más azúcares. El aglicón de las antocianinas del Bourbon Rojo es cianidina, mientras que el azúcar sustituyente es glucosa. Las dos antocianinas detectadas en la pulpa del cultivar Bourbon Rojo son cianidina 3-glucósido y cianidina 3-diglucósido.

Apéndice N° 03 Equipos, Materiales y Reactivos Empleados

1. Equipos

Balanza Analítica con 04 dígitos de precisión.

Centrífuga Rotofix 2 velocidades.

Equipo de ultravioleta (UV –1601/ UV Visible Spectrophotometer Shimadzu Corp.).

Refrigeradora.

Desecador.

pH digital y de mesa.

Rotavapor Yamato Modelo RE 46.

Water Bath BM 42.

Equipo de Rectificación de alcoholes.

Agitadores magnéticos.

Equipo de absorción atómica (AA 6701 F Atomic Absorption Flama Emisión Spectrophotometer Shimadzu Corporation).

Bomba de vacío Crompton Greaves N° AFG 110017, 0.5 HP, 1725 rpm.

2. Materiales de vidrio

Baguetas.

Bureta de 50 y 10 mL.

Embudo.

Fiolas de 25, 5 mL.

Crisoles.

Mortero.

Papel filtro (semilento).

Pipetas de 5 y 1 mL.

Porta embudo

Vasos de precipitación de 250 mL

Viales de 15 mL

Lunas de reloj

Bombillas de succión.

3. Reactivos

Alcohol etílico 96 %.

Ácido clorhídrico 8 N.

Acetato de plomo QP.

Hidróxido de sodio perlas.

Ácido Clorhídrico grado reactivo.

Tricloruro de aluminio hidratado.

Metanol PA.

Metanol destilado.

Sodio metálico.

Ácido bórico anhidro grado reactivo.

Acetato de Sodio hidratado.

Apéndice N° 04 Análisis espectral UV para flavonoides usando reactivos de desplazamiento

1. Preparación de solución de reserva de:

- 1.1 Flavonoide: Disolver una pequeña cantidad de flavonoide (0.1mg), en 10 mL de CH₃OH grado espectroscópico, tal que el pico de mayor absorción entre 250 y 400 presente una densidad óptica entre 0.6 y 0.8.
- 1.2 NaOMe: Agregar cuidadosamente 2.5 g de Na metálico recién cortado a 100 mL de CH₃OH anhidro grado espectroscópico.
- 1.3 AlCl₃: 5 g de AlCl₃ anhidro reactivo. Agregue cuidadosamente a 100 mL de CH₃OH grado espectroscópico.
- 1.4 HCl: HCl concentrado grado reactivo (50 mL) se mezcla con agua destilada (100 mL). Almacenar en frasco tapado.
- 1.5 H₃BO₃: Se usa H₃BO₃ anhidro en polvo grado reactivo para el procedimiento (b), y una solución de CH₃OH (100 mL) grado espectroscópico saturado con H₃BO₃ anhidro grado reactivo para el procedimiento (a).

2. Análisis espectral

- 2.1 En CH₃OH: Medir el espectro con 2 o 3 mL de solución de reserva 1.1
- 2.2 En NaOMe: Medir inmediatamente después de la adición de 3 gotas de solución de reserva 1.2 a la solución anterior 2.1. Medir nuevamente el espectro después de 5 min. Descartar la solución.
- 2.3 En AlCl₃: Medir después de la adición de 3 gts. De solución de reserva 1.3 a 2-3 mL de la solución de reserva 1.1.
- 2.4 En AlCl₃/ HCl: Medir inmediatamente después de la adición de 3 gts de solución de reserva 1.4 a la solución 2.3. Descartar la solución.
- 2.5 En NaOAc: Se determina después de agregar un exceso de NaOAc en polvo a la cubeta conteniendo 2-3 mL de la solución de reserva 1.1. Registrar

dentro de dos minutos de la adición y nuevamente a los 5-10 min para comprobar si hubo o no descomposición. Descartar la solución.

- 2.6 En NaOAc/H₃BO₃: Puede aplicarse 2 métodos dependiendo de si hubo o no descomposición durante el registro en NaOMe. En el primer caso usar procedimiento (a), y en el segundo caso el procedimiento (b):

Procedimiento (a): 5 gotas de solución de reserva 1.5, se agrega a 2-3 mL solución de reserva 1.1. Saturar rápidamente la solución con NaOAc y registrar el espectro.

Procedimiento (b): A la cubeta de 2.5 agregar suficiente H₃BO₃ en polvo, grado reactivo, para dar una solución saturada. Registrar el espectro y descartar la solución.