

12
29

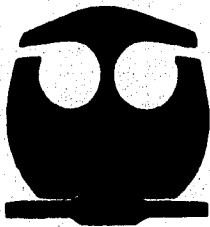


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO QUIMICO DE JUSTICIA
SPICIGERA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
INGENIERA QUIMICA
P R E S E N T A :
MARIA GUADALUPE AZPEITIA GALAVIZ



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Prof. José María García Saiz.

VOCAL: Profa. Yolanda Caballero Arroyo.

SECRETARIO: Prof. Jaime Medina Oropeza.

1er. SUPLENTE: Prof. Federico Jesús Jiménez Cruz.


2o. SUPLENTE: Prof. Gustavo Guevara Soto.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**LABORATORIO 2A, EDIFICIO A, DEPARTAMENTO DE QUIMICA
ORGANICA, FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.**

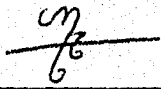
**LABORATORIO 3C, EDIFICIO A, DEPARTAMENTO DE
QUIMICA ANALITICA, FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.**

ASESOR:



Dra. Yolanda Caballero Arroyo

SUSTENTANTE:



Maria Guadalupe Azpeltia Galaviz

GRACIAS

*

A mi madre, María de los Angeles Galanté

A mi padre, Salvador Appetia

A mis hermanos: Juanita, Mary y Chauz

*Por brindarme la oportunidad de llegar hasta esta meta,
por su apoyo para subir hasta la cumbre, por ser
mi equipo número 1.*

*

A Arturo, mi cuñado

A Arturita y Marianita, mis sobrinos

*

GRACIAS

*

A mis amigas: Blanca Ivette Córdova y Elizabeth Cabañas

*

A los compañeros de la Facultad con quienes trabajé y conviví

*

A la Facultad de Química

*

A la Universidad Nacional Autónoma de México,

la indiscutible máxima casa de estudios

*

*A las Profas. Graciela Chavez y Marisela Gutiérrez, por haber obtenido los
espectros UV-VIS e IR*

*

A Marcela y Gloria, del Laboratorio 3C, por su ayuda

*

GRACIAS

*

A la Z. Graciela Fernández, por su valiosa aportación e interés particular hacia mi trabajo y mi persona, por haberme brindado su ayuda y por su cálida amabilidad

*

A la Dra. Yolanda Caballero, por haber confiado en mí para realizar este trabajo, por querirme y caminar conmigo en la ruta que me condujo a la culminación de tantas inquietudes e ideas cuya imagen está plasmada en esta tesis; por sus conocimientos y por su calidad humana, por todo cuanto hice y compartí a su lado

*

FLORIDO LAUDE
(fragmentos)

Miro como el Acanto
lanza la espiga erecta de sus torres
y cómo los Delfinios
yerguen, música azul, sus campanarios.

¿Qué licor impalpable
brindan, alto Alcatraz, tus copas blancas?

Te admiro dura y rara, hostil y gloriosa
seca y amarga y vivida
como la recia planta que decoras
cuando estalla tu rojo en la Biznaga
que coronas minúscula de estrellas;
cuando del Nopalillo que serpea
entre rocas de lava congelada,
brotas como una estrella de alabastro
o sangras como herida de la piedra.

Te miro, Flor de Mayo, Jacalásúchil,
redimir la pobreza de tus troncos
con una geometría perfumada y perfecta;
te miro, Cempasúchil,
flor de los muertos y de los pobres,
enriquecer y resucitar a mi raza.

Y te aspiro, Gardenia,
Jazmín, Huevo de Noche, Estrella de día;
Heliotropo, Azucena, Nardo;
porque eres forma, color y perfume;
porque eres, flor, la esencia de la vida,
la juventud del mundo, la belleza del aire,
la música cifrada del orbe;
porque eres frágil, breve, delicada,
y corres a la muerte que te inmola y te consagra,
y eterniza.

Lo menos que yo puedo
para darte las gracias porque existes;
para alabar a Dios que te ha creado,
¡oh, flor, milagro múltiple!
es conocer tu nombre y repetirlo
en una letanía de colores
y en una sinfonía de perfumes.

INDICE

	<u>Página</u>
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	4
CAPITULO 1. El muicle (<i>Justicia spicigera Schlecht</i>), otro ejemplo de la herbolaria tradicional de México.	
1.1. El muicle: pasado y presente.	5
1.2. Identificación botánica.	8
1.2.1. Origen de la identificación.	8
1.2.2. Distribución geográfica.	8
CAPITULO 2. Colorantes y pigmentos.	
2.1 El color y sus propiedades.	11
2.2. Estructuras químicas que causan el color.	12
2.2.1. Cromóforos.	12
2.2.2. Auxocromos.	13
2.2.3. Estructura molecular.	14
2.3. Colorantes y pigmentos.	16
2.4. Pigmentos vegetales.	16
2.4.1. Compuestos tetrapirrólicos.	17
2.4.2. Derivados del isopreno.	18

2.4.3. Derivados del benzopirano.	20
2.4.4. Propiedades de los flavonoides.	26
A. Fungicidas	27
B. Actividad antidiarreica.	27
C. Actividad estrogénica.	27
D. Actividad contra moluscos.	27
E. Antitumoral.	28
F. Actividad sobre los insectos.	28
G. Nuevos edulcorantes.	28
H. Copigmentos.	29
I. Actividad antiinflamatoria.	28
J. Agentes antihepatotóxicos.	30
K. Agentes espasmolíticos.	30
2.4.5. Derivados de la 1,7-diazoheptametina.	31
A. Betacianinas.	32
B. Betaxantinas.	33
2.4.6. Derivados de la benzofenona.	34
A. Quinonas.	35
B. Xantonas.	36
2.4.7. Compuestos fenólicos poliméricos.	37
A. Hidrolizables.	37

B. No hidrolizables.	37
2.4.8. Antocianidinas.	39
A. Estructura	39
B. Usos e importancia de las antocianinas.	44
C. Efecto del pH.	44
D. Efecto de la temperatura.	47
E. Efecto del oxígeno y la luz.	48
F. Reacciones de condensación.	48
G. Reacción con SO ₂	49
H. Reacción con peróxidos.	50
I. Efecto enzimático.	51
J. Complejos metálicos.	51
K. Métodos de aislamiento y caracterización.	52
K.1. Extracción.	53
K.2. Cromatografía.	55
K.3. Espectroscopía.	59
K.4. Otros métodos experimentales.	62
K.5. Hidrólisis de antocianinas.	62
CAPITULO 3. Trabajo experimental.	
3.1. Observaciones preliminares.	63
3.1.1. El punto de partida: indicios de la presencia de un pigmento	

de la especie antocianina.	63
3.1.2. Forma de adquisición del vegetal.	63
3.1.3. Aspecto físico y solubilidad.	63
3.2. Pruebas de estabilidad.	64
3.2.1. Efecto de la temperatura.	64
3.2.2. Efecto del pH.	68
3.2.3. Comportamiento del extracto acuoso concentrado.	71
3.3. Caracterización del pigmento hidrosoluble.	73
3.3.1. Cromatografía de capa fina y espectros UV-VIS e infrarrojo.	73
3.3.2. Formación de complejos con plomo.	77
3.3.3. Cromatografía, espectros UV-VIS e infrarrojo y punto de fusión del producto A.	79
3.3.4. Formación de complejos con aluminio: un ensayo breve.	82
3.4. Identificación de los precipitados formados en solución acuosa: ensayos a la gota.	83
3.5. Cuantificación de hierro en hojas de <i>Justicia spicigera</i> .	84
3.5.1. Parte experimental.	84
3.5.2. Resultados experimentales y cálculos.	87
A. Cálculo de la concentración de los estándares.	88
B. Regresión lineal y cálculo de las concentraciones de las	

soluciones problema.	88
C. Cálculo de las partes por millón.	89
D. Desviación estándar y partes por millón promedio.	89
CAPITULO 4. Conclusiones y recomendaciones.	
4.1. Conclusiones.	100
4.2. Recomendaciones.	102
APENDICE I.	104
APENDICE II.	123
BIBLIOGRAFIA.	132

I N T R O D U C C I O N

En nuestros días, cada vez con mayor fuerza, se observa una tendencia hacia la búsqueda de productos, para los más diversos usos, cuyo origen sea estrictamente natural. La contaminación de mantos acuíferos, la tierra y el aire; el deterioro en la salud humana debido a la contaminación y el consumo o contacto frecuente de la población con elementos nocivos a la salud, tales como insecticidas, plomo, hidrocarburos, etc., son causas de dicha búsqueda.

Entre las labores de investigación que se ocupan de obtener de fuentes naturales sustancias que no sean perjudiciales al organismo humano se cuentan las dedicadas a la investigación de colorantes. Los colorantes están presentes en un cúmulo de productos: alimentos, fármacos, cosméticos, pinturas, textiles, etc. Es por esto que para varios investigadores, principalmente en el área de la industria alimentaria, ha resultado de utilidad el trabajo en torno al conocimiento del grupo de pigmentos vegetales denominado antocianinas -en forma de glicósidos- o antocianidinas, si se habla de sus agliconas.

Las antocianinas son las responsables de los colores de flores y frutos diversos; son varias las razones por las cuales han despertado gran interés en el mundo de la investigación: la más importante es, muy probablemente, la necesidad de desarrollar colorantes inocuos, económicos y eficientes que sustituyan a los colorantes artificiales que usualmente se emplean en la fabricación de alimentos. Para este propósito, las antocianinas poseen las siguientes ventajas: el hombre las ha consumido por generaciones sin que se hayan registrado efectos adversos en la salud debido a su consumo; son entidades químicas de colores brillantes, especialmente las de tono rojo

y, por presentarse en forma de glicósidos, son notablemente solubles en agua, lo que simplifica su incorporación a sistemas acuosos alimentarios.

Por otra parte, cabe mencionar ciertas desventajas inherentes a las antocianinas: su estabilidad química es reducida, presentan cierta dificultad en su purificación y su poder de tinción es aproximadamente 100 veces menor que el de los tintes convencionales.

Dentro de este grupo, del cual se ocupará el presente trabajo, destaca la investigación en torno a un vegetal conocido por la población nacional desde la época anterior a la llegada de los españoles. Este vegetal - *Justicia spicigera Schl.*, o muicle, su nombre vulgar- también goza de atributos medicinales, cuyo origen es la tradición popular, a través de los médicos primitivos o chamanes, desde la antigüedad y que ha sobrevivido hasta nuestros días, constituyendo la llamada "medicina alternativa", la herbolaria medicinal y los remedios caseros.

En el contexto anterior, tiene cabida el siguiente escrito:

"En México el término herbolaria se refiere a las plantas medicinales utilizadas por la población como recurso natural médico para aliviar sus padecimientos...

... Es en el siglo XVI cuando se recoge y escribe el conocimiento médico herbolario indígena:

-Códice Florentino, escrito por Fray Bernardino de Sahagún, especialmente el Libro XI (Hierbas Medicinales).

-Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis, cuyo autor es Martín de la Cruz y fue traducido al latín por Juan Badiano.

-Historia Natural de la Nueva España, de Francisco Hernández.

... El estudio de la herbolaria mexicana a la luz de la investigación clínica se observa, en gran medida, en el siglo XVIII y de investigación experimental farmacológica desde el siglo XIX hasta la fecha".

La información anterior corresponde al Herbario del I.M.S.S. (23).

Es conveniente aclarar que sólo se halló un trabajo de investigación química de *Justicia spicigera Schl.* para la elaboración de antecedentes y que será comentado en el capítulo 2.

¿Cómo se originan las creencias populares acerca de las propiedades curativas de los vegetales? Es posible explicar esto en base a la "Teoría de la Signatura o de las Señales", la cual afirma que el aspecto externo de una planta informaba sobre las dolencias que podía curar. Esta teoría tiene origen empírico, como se podrá apreciar, y Paracelso fue uno de sus defensores. Entonces resulta fácil imaginar cómo un té que presenta una intensa coloración roja diera origen a creer que el vegetal en cuestión poseía algún poder curativo sobre afecciones relacionadas con la sangre.

Por lo expuesto anteriormente, le corresponde a la Química y la Medicina comprobar o desmentir con rigor científico las cualidades curativas asociadas a cualquier vegetal, lo que se traducirá en conclusiones de gran utilidad para todos.

OBJETIVOS

Este trabajo se propone cumplir con los siguientes objetivos:

1. Presentar una breve teoría del color.
2. Exponer el conjunto de familias químicas cuya importancia es la de ser colorantes del reino vegetal.
3. Describir el contexto histórico en el que participa *Justicia spicigera Schl.*
4. Clasificar químicamente la sustancia de color rojo hidrosoluble que presenta la especie vegetal mencionada.
5. Registrar todo hallazgo químico que se encuentre durante el trabajo experimental.

Los objetivos de los incisos 4 y 5 se verificarán dentro del terreno experimental, básicamente en el sentido cualitativo, en tanto que el resto de los objetivos tendrán la función de resaltar -no sólo apoyar- el trabajo en el laboratorio y las bondades que se desprendan del estudio fitoquímico.

CAPITULO 1

**EL MUICLE (*Justicia spicigera*
Schlecht), OTRO EJEMPLO DE LA
HERBOLARIA TRADICIONAL DE
MEXICO**

1.1. EL MUICLE: PASADO Y PRESENTE.

Francisco Hernández, en su obra "Historia de las Plantas de Nueva España" (25) cita un vegetal llamado "mohuitli", es decir, "hierba purpúrea", cuya descripción enuncia en estos términos:

"Es una hierba con raíces ramificadas, de donde nacen tallos de dos palmos, sarmentosos, torcidos y cilíndricos, y flores escarlata alargadas; hojas como de yerbamora algo blanquecinas por debajo, que tienen un sabor exactamente como de pepinillo. Es de naturaleza fría o templada y glutinosa...Nace en los lugares planos o en las alturas de Hoaxtepec..."

Esta hierba es la que se clasificó como *Justicia spicigera* Schlecht. Citando al ya mencionado texto, se nombra popularmente "micle", "mohuite", "moictle", "moytli" y "mohintle", de acuerdo a los diferentes estados de la República. Así mismo, Martínez (29) menciona los nombres de "trompetilla", "mayotli", "mozote" y "yich-kaan" en maya, todos designando a *Justicia spicigera*.

De acuerdo con el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (1) (24), se reportan los siguientes usos y sinonimia del muicle -muy singulares, a juzgar por el resto de la literatura consultada- cuyos orígenes son netamente populares:

-El muicle es útil para cuando "se está medio trastornado de la mente" (sic), para bañar a los niños con alferecía (sinónimo de epilepsia), en casos de salpullido infantil. (Puebla).

-Enfermedad del niño (Guerrero).

-Estreñimiento (Edo. de México).

-Otros usos: en caso de anginas, tiricia (falta de ánimo), mal de ojo y dolor interno.

-Nombres vulgares: "mouait" (lengua tepehua), "mucle" (Misantla, Ver.), "muitlic" (Tlaxcala), "shankentocni" (lengua otomí, Puebla).

El nombre náhuatl es "mohuítli" y se tienen de él datos que señalan su uso por los pobladores prehispánicos en las siguientes formas:

1) Como planta medicinal, cuyas virtudes curativas se aplican en casos de disentería, flujo menstrual excesivo y la sarna (25); también se usa para la epilepsia y para calmar los nervios (29).

2) Como colorante, en el teñido de sus telas.

Cabe señalar que teniendo en cuenta los instrumentos con los que contaban, se puede afirmar que los pobladores prehispánicos alcanzaron un desarrollo muy importante en la técnica del teñido, que les permitía extraer y mezclar una amplia gama de colores, usando para ello tintes de origen animal, vegetal y mineral.

Se tienen datos del uso de mordientes como el alumbre y la alcaparrosa (protosulfato de hierro, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ó $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), que se empleaban para fijar o modificar el tono del colorante. Los más numerosos eran los tintes de origen vegetal, derivados de flores, frutos, tallos, hojas, semillas y raíces de plantas, líquenes y corteza o madera de los árboles.

El azul índigo o añil se producía con la planta llamada xiuhquilitl (*Indigofera suffruticosa* Mill; añil L.). Se cortaban las hojas y se preparaba un colorante azul llamado "tlacehoilli" o "mohuitl", con el que se obtenía un tono que iba del azul al

negro. También se usaba para teñir los cabellos de negro azulado. Así mismo, obtenían otro tono de azul del muicle. El anaranjado lo extraían de la semilla del achiote o "achiyotl" (*Bixa Orellana L.*). El negro se producía con el hollín del pino.

El famoso palo de Brasil (*Haematoxylum brasiletto K.* y *H. campechianum*) o palo de Campeche, como se conoció en México, daba un tinte rojo muy apreciado que se modificaba de tono según el mordiente empleado.

En cuanto a los colorantes de origen animal, el más importante, tanto en la época prehispánica como en la colonia, llegando hasta nuestros días en ciertas comunidades, fue la grana o cochinilla (*Coccus cacti L.*) que los indígenas denominaban "nochezli" (sangre de tunas). El otro colorante de importancia de origen animal era el "caracol", tintura de color violeta púrpura que se extraía de un molusco marino (*Purpura patula pansa*) que se encuentra a lo largo de las costas rocosas del Pacífico, desde México hasta Perú.

Por último, es conveniente mencionar algunos de los colorantes de origen mineral usados en la época precolombina. Provenían principalmente de ciertas tierras y óxidos de hierro; el blanco se extraía del gis y del yeso, el ocre suministraba el amarillo y el rojo se obtenía del óxido de hierro (36).

Actualmente, en la Ciudad de México se consume el muicle -su nombre popular en esta zona- como té. El tradicional Mercado de Sonora es el principal proveedor de este vegetal entre los habitantes; es en este sitio donde se recomiendan usos tales como para quitar el dolor de estómago producido por la "regla", para disminuir la menstruación, tomado en té y para tomarlo como "tecito" en las mañanas. Esta planta

se la define como de naturaleza fría (25) (29). Otros usos medicinales son: para fortalecer la sangre y en casos de anemia; también para tratar cicatrices o lesiones en la piel, desórdenes gastrointestinales como náuseas, dolor estomacal, diarrea y retortijones (16).

1.2. IDENTIFICACION BOTANICA.

1.2.1. ORIGEN DE LA IDENTIFICACION.

Se envió un ejemplar vegetal al Herbario Nacional, con sede en el Instituto de Biología, donde fue identificado como *Justicia spicigera Schl.*, *Acanthaceae*; la identificación estuvo a cargo del M. en C. Oswaldo Téllez y el Sr. Francisco Ramos.

REINO: Vegetal
SUBDIVISION: Angiospermae
ORDEN: Turbiflorae
CLASE: Dicotyledoneae (Corola gamopétala. Ovario súpero)
FAMILIA: Acanthaceae
GENERO: Justicia
ESPECIE: Justicia spicigera Schlecht

1.2.2. DISTRIBUCION GEOGRAFICA.

Planta nativa de México y Centroamérica, ampliamente cultivada en zonas de clima templado y tropical del país.

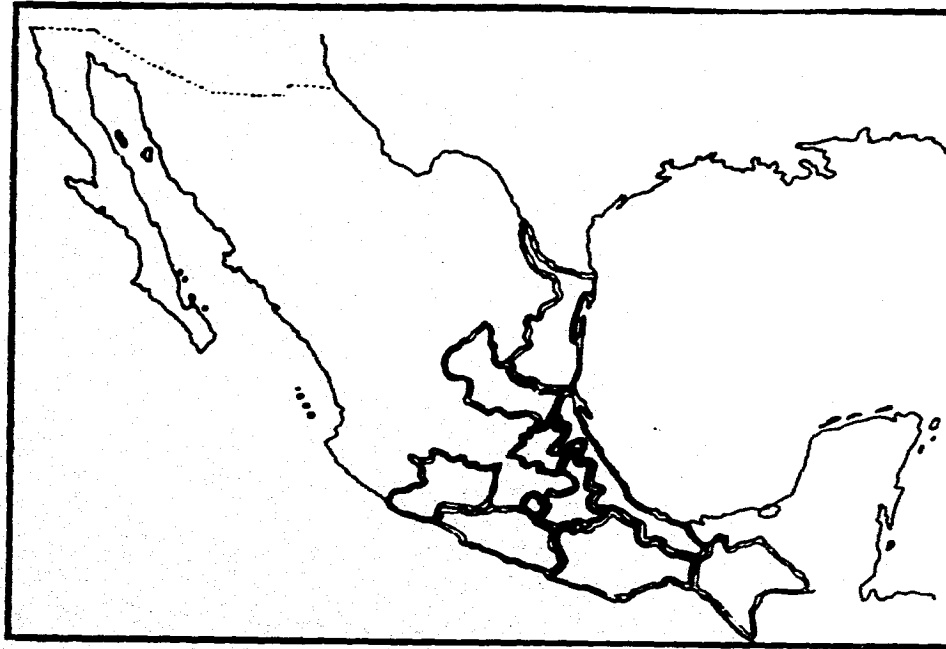


FIGURA 1.1. Distribución geográfica basada en muestras de herbario (E. Linares et al (29)).

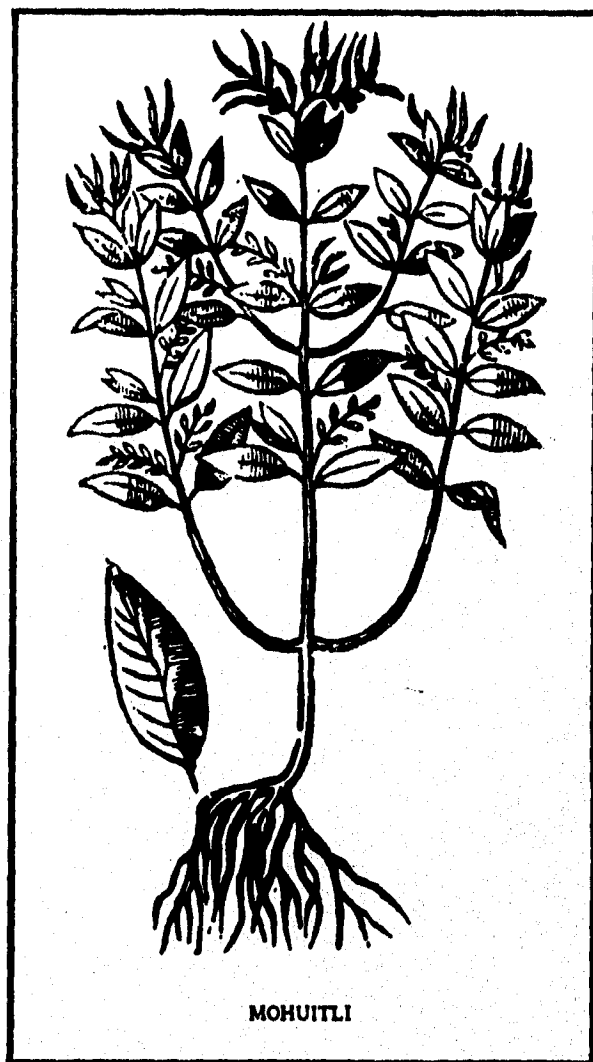


FIGURA 1.2. Ilustración de Francisco Hernández (25).

CAPITULO 2

COLORANTES Y PIGMENTOS

2.1. EL COLOR Y SUS PROPIEDADES.

A pesar de los numerosos estudios que desde distintos campos de la Ciencia se han hecho sobre la naturaleza y percepción del color, lo cierto es que aún no se tiene una definición concreta del mismo ni existe una teoría unificada del color. En el fenómeno cromático se superponen componentes físicos, fisiológicos y psíquicos por lo que, en su aparición, hay que tener en cuenta factores de los tres componentes mencionados.

Para fines prácticos, sin embargo, podemos considerar el color como energía electromagnética comprendida dentro del espectro visible, es decir, entre 400 y 700 nm, que al incidir sobre la materia, puede ser absorbida total o parcialmente produciendo una alteración tanto en la luz incidente como en la estructura material del cuerpo sobre el que incide.

TABLA 2.1. CARACTERISTICAS DEL ESPECTRO VISIBLE

LONGITUD DE ONDA DE LA LUZ ABSORBIDA (nm)	COLOR DE LA LUZ ABSORBIDA	COLOR VISIBLE
400-420	Violeta	Verde amarillento
420-450	Violeta azulado	Amarillo
450-490	Azul	Naranja
490-510	Azul verdoso	Rojo
510-545	Verde	Púrpura
545-580	Verde amarillento	Violeta
580-630	Naranja	Azul
630-720	Rojo	Azul verdoso

Un cuerpo aparece de color negro cuando la absorción del espectro visible es total; si rechaza todas las radiaciones es de color blanco; de color gris si las absorbe en

igual proporción y diversamente coloreado si absorbe de preferencia alguna de las radiaciones componentes; en el último caso, el color es el complementario de las radiaciones absorbidas.

La absorción también se produce en longitudes de onda superiores (infrarrojo) o inferiores (ultravioleta) del espectro, pero entonces el sentido de la vista no aprecia cambio cromático alguno y han de utilizarse aparatos especiales (espectrofotómetros) para detectar y medir la radiación electromagnética. No todos los colores de la naturaleza se deben a compuestos químicos, y algunos dependen del diseño arquitectónico para producir el color gracias a la difracción de la luz; por ejemplo, los colores de los colibríes, pavorreales y algunas mariposas y escarabajos.

2.2. ESTRUCTURAS QUIMICAS QUE CAUSAN EL COLOR.

Para iniciar, se propone el siguiente esquema que expresa los elementos causantes del color:

COLOR DE LAS ESPECIES QUIMICAS	INORGANICAS	Iones sencillos Iones complejos Precipitados
	ORGANICAS	Cromóforos Auxocromos Estructura molecular

En el caso de las especies orgánicas, un gran número absorbe radiación electromagnética en las regiones infrarroja y ultravioleta del espectro, por lo que las sustancias aparecen incoloras.

2.2.1. CROMOFOROS.

Si una molécula orgánica posee electrones móviles o poco localizados (electrones π , generalmente) tiene muchas posibilidades de que éstos sean excitados por la baja energía proporcionada por las frecuencias del espectro visible, con la consiguiente aparición del color. De aquí que el color en las moléculas orgánicas esté

asociado a la existencia de centros de insaturación (dobles y triples enlaces, estructuras quinoideas, etc.) o la posibilidad de resonancia entre dos o más configuraciones moleculares.

A O.N. Witt se debe el concepto de cromóforo (del griego "portador de color"), quien revisó distintas sustancias orgánicas coloreadas y halló que todas tenían un grupo no saturado, al que nombró de tal forma.

En general, se necesita más de un grupo cromóforo para que aparezca el color, y si aparecen en forma conjugada intensifican el color.

Una relación de los principales grupos cromóforos en orden decreciente (de izquierda a derecha) de su facilidad de excitación (posibilidad de originar color) es la siguiente:

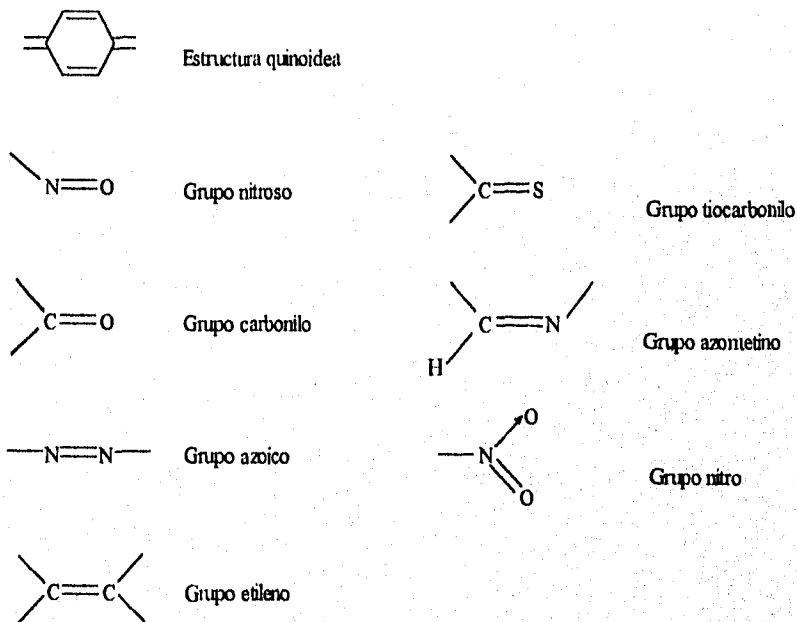
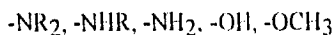


FIGURA 2.1.

2.2.2. AUXOCROMOS.

El mismo Witt observó que ciertos radicales de tipo salinógeno son capaces de reforzar la acción de un cromóforo, aunque por sí mismos no puedan comunicar color a

moléculas incoloras. A estos radicales les llamó auxocromos ("exaltador de color") y señaló como más importantes, en orden decreciente de su efecto, a los siguientes:



También los átomos de los halógenos intensifican el color, decreciendo su efecto del yodo al cloro.

El efecto de los auxocromos se atribuye a un aumento de las posibilidades de resonancia en las moléculas donde se verifica la sustitución. En un anillo bencénico que contenga un cromóforo, la posición de un grupo auxocromo en orto o en para tiene un efecto mucho más notable que en meta, posición ésta que apenas ejerce influencia cromática.

2.2.3. ESTRUCTURA MOLECULAR.

La teoría de los orbitales moleculares se aplica para interpretar las relaciones entre la estructura de los compuestos orgánicos y la aparición del color.

Los tres tipos de electrones de valencia que pueden dar lugar a transiciones electrónicas en una molécula orgánica son:

A. σ , electrones sigma, generalmente implicados en la formación de un enlace simple.

B. π , electrones pi, que entran en la formación de un doble enlace.

C. n , electrones denominados no enlazantes.

Los orbitales moleculares con muy pequeña densidad electrónica entre los núcleos se llaman orbitales antienlazantes y se designan con un asterisco (*).

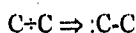
En las moléculas orgánicas saturadas sólo puede haber transiciones $\sigma \rightarrow \sigma^*$ que requieren una gran energía, por lo que absorben en el ultravioleta lejano.

Los electrones no enlazantes suelen encontrarse deslocalizados, o móviles, por lo que las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ requieren menor energía para su excitación, bastando la energía de la región visible del espectro.

Las energías de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ adquieren valores intermedios entre las de los dos anteriormente citados y para ellas se necesita absorción en el visible o ultravioleta próximo.

Cuando un compuesto orgánico tiene varios enlaces dobles con uno sencillo entre ellos (enlaces conjugados), se origina un desplazamiento batocrómico en el máximo de absorción de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$.

Una modificación de la teoría de los orbitales moleculares es el modelo del enlace de valencia, que postula los fenómenos de resonancia, responsables, frecuentemente, de la aparición del color. En moléculas orgánicas con enlaces múltiples, los electrones π no están localizados cerca de los átomos de carbono, sino que son comunes a toda la molécula. Se pueden mover u oscilar cerca de uno de los átomos a los que comunica una carga negativa, quedando cargado positivamente el átomo vecino y formándose así un dipolo:



Cuando estos desplazamientos de electrones se producen a lo largo de una cadena con enlaces conjugados resulta una polarización de la molécula. Esta molécula puede tomar dos o más formas iónicas alrededor de una posición fundamental no polarizada. Se dice entonces que el sistema fundamental está en resonancia con las estructuras iónicas extremas.

El fenómeno de la resonancia aumenta las posibilidades de absorción de las longitudes de onda correspondientes al espectro visible, debido, fundamentalmente, a los electrones π de los enlaces dobles; a medida que aumenta la conjugación de los enlaces y la molécula es más larga, decrece la energía necesaria para una transición. Todos los átomos que por su polarización faciliten los desplazamientos de electrones y conduzcan más fácilmente a formas resonantes, facilitarán la absorción luminosa por la molécula y, por lo tanto, la aparición del color. El nitrógeno, el oxígeno y el azufre son los átomos que más frecuentemente facilitan la formación de especies en resonancia.

Se puede considerar que la absorción será tanto más intensa y más desplazada hacia el rojo cuanto más larga sea la cadena conjugada y, en particular, si ésta termina en dos átomos, o grupos de átomos, capaces de experimentar el fenómeno de resonancia.

Por último, se puede afirmar que los auténticos cromóforos son las cadenas de enlaces dobles conjugados que asociados a átomos de nitrógeno o de oxígeno, presentan resonancia. Los átomos terminales de nitrógeno, oxígeno, los grupos aminados y fenólicos, sustituidos o no, son los auxocromos que permiten la resonancia. El resto de la molécula no hace más que acentuar o disminuir el efecto de aquélla.

2.3. COLORANTES Y PIGMENTOS.

Se define, en sentido general, a un colorante como cualquier sustancia que imparte color a un objeto. Un colorante puede estar 1) naturalmente presente en la materia (clorofila, en los vegetales) o bien 2) artificialmente asociado a la materia (tintes sintéticos, pigmentos secos en pinturas).

Por lo ya expuesto, surge la definición de colorante natural: aquél obtenido a partir de fuentes naturales.

Para los fines del presente trabajo, se define un pigmento natural como los constituyentes normales de las células o tejidos que imparten color (17), esto es, en organismos animales y vegetales. Los pigmentos pueden tener propiedades que van más allá de las de los colorantes, por ejemplo, como receptores de energía, transportadores de oxígeno o protectores contra la radiación.

Las definiciones anteriores son válidas de acuerdo al contexto en el que se expone este trabajo, por tanto, cuando se hable de colorantes o pigmentos se van a observar las definiciones antes señaladas.

Es interesante la forma en que diversos autores trabajan con la terminología que se plantea en este rubro. Fennema (17) expone una síntesis teórica muy clara sobre estos conceptos, la cual resulta muy útil para todos los que se inician en el estudio de la química de alimentos y la fitoquímica.

2.4. PIGMENTOS VEGETALES.

Se puede proponer la siguiente clasificación elemental de pigmentos:

- A. CAROTENOIDES
- B. CLOROFILAS
- C. FLAVONOIDES
- D. BETALAINAS
- E. QUINONAS Y XANTONAS
- F. TANINOS

Para ubicar en el terreno de la Química Orgánica a éstos resultará más útil la clasificación propuesta en la tabla 2.2. Cabe señalar que existen autores que prefieren subdividir el tercer grupo en dos tipos: flavonoides y antocianinas, sin embargo, se prefiere la forma presentada en la tabla señalada.

TABLA 2.2. CLASIFICACION DE PIGMENTOS VEGETALES.

GRUPO QUIMICO	TIPO DE PIGMENTO
COMPUESTOS TETRAPIRROLICOS	Clorofila
DERIVADOS DEL ISOPRENO	Carotenoides
DERIVADOS DEL BENZOPIRANO	Flavonoides
DERIVADOS DE LA 1,7-DIAZOHEPTAMETINA	Betalainas
DERIVADOS DE LA BENZOFENONA	Quinonas y xantonas
COMPUESTOS FENOLICOS POLIMERICOS	Taninos

2.4.1. COMPUESTOS TETRAPIRROLICOS.

La unidad básica de la cual toman su carácter es el pirrol. En este género se identifica a la clorofila, término que inicialmente se empleó para describir aquéllos pigmentos verdes implicados en la fotosíntesis de las plantas superiores. Actualmente, se ha extendido a toda clase de pigmentos porfirínicos fotosintéticos. Esto es correcto en general, salvo en casos aislados muy específicos.

Los tipos de clorofila más importantes son la a y la b; pero la primera se encuentra en mayor proporción (3:1); existen, además, otras de menor importancia y algunas de origen microbiano. Cabe señalar que se llaman porfirinas a las estructuras formadas por todos los tetrapirroles próximos entre sí completamente conjugados.

La presencia del grupo fitol -esterificando al grupo propionato- es el responsable de la insolubilidad de la clorofila en agua.

Otros aspectos de relevancia son las diferencias en tonalidad de las clorofilas principales: la del tipo a es de color azul-verdoso, en tanto que la tipo b es de tono amarillo-verdoso (38). Se estima que el contenido promedio de clorofila (11), en general, es aproximadamente 0.1 a 0.2 % en peso en las hojas verdes.



Pirrol

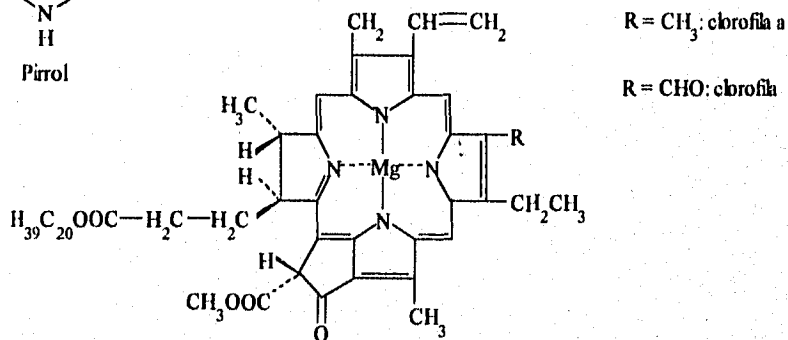
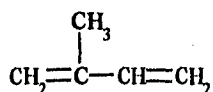


FIGURA 2.2.

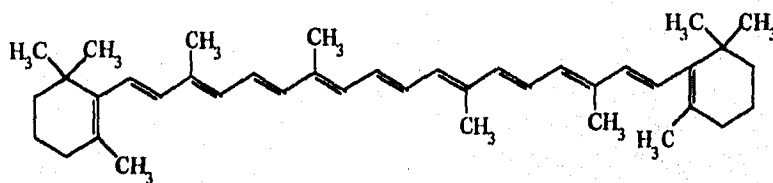
2.4.2. DERIVADOS DEL ISOPRENO.

En este grupo se identifican los pigmentos carotenoides. La estructura química básica de la mayoría de estos compuestos es poliénica de 40 átomos de carbono, formada por 8 unidades de isopreno (figura 2.3.), unidos de tal forma que las unidades isoprenoides se invierten en el centro de la molécula. Son liposolubles y a éstos se debe la coloración amarilla, naranja e incluso roja de varios productos vegetales y animales.

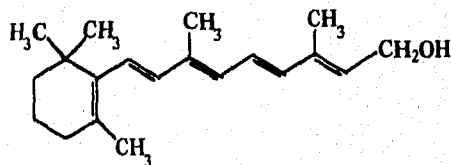
Se hallan ampliamente distribuidos y existen en la naturaleza en grandes cantidades. Se ha calculado una producción anual en la naturaleza de más de 100×10^6 ton. de carotenoides (17). Su nombre deriva de la zanahoria, *Daucus carota*, ya que se les aisló por primera vez a partir de esta hortaliza. En la naturaleza se han identificado más de 420, en su mayoría encontrados en las hojas verdes (2); los carotenoides siempre acompañan a la clorofila en una relación de 3 a 4 partes de clorofila por una parte de carotenoides (38).



Isopreno



β -Caroteno



Vitamina A

FIGURA 2.3.

Hay dos formas posibles para clasificar a los carotenoides. La primera señala dos clases principales:

- CAROTENOS, compuestos que son hidrocarburos.

- XANTOFILAS, compuestos que contienen oxígeno en la forma de grupos hidroxilo, metoxilo, carboxilo, ceto y epóxi. Se dice que son derivados oxigenados de los carotenos.

La segunda forma divide a los carotenoides en tres tipos:

- ACICLICOS, tal como el licopeno.
- MONOCICLIOS, cuyo ejemplo es el γ -caroteno.
- BICICLICOS, es decir, especies como el α -caroteno y el β -caroteno

Los carotenos son biológicamente muy importantes para el hombre, ya que son convertidos en vitamina A. Se han extraído, a partir de los alimentos, los tres tipos de carotenos antes señalados en proporciones aproximadas de 84 % β -caroteno, 15 % α -caroteno y 0.1 % de γ -caroteno (19).

Por citar un ejemplo de la presencia de los carotenoides en los animales, véase el caso de ciertos crustáceos comestibles, que tienen un pigmento carotenoide asociado a una proteína, dando como resultado una coloración azul o gris-azul; cuando el animal es sumergido en agua caliente, la unión del carotenoide y la proteína se rompe, apareciendo el color anaranjado o rojo del pigmento carotenoide liberado.

2.4.3. DERIVADOS DEL BENZOPIRANO.

Los flavonoides y los compuestos relacionados con ellos están ampliamente distribuidos en los tejidos de las plantas. Estos pigmentos se encuentran en la vacuola de la célula disueltos en la savia, por lo que están presentes en tejidos leñosos, hojas, flores y frutos. Hay una creciente evidencia de que ciertos flavonoides están presentes en los cloroplastos y probablemente en otros organelos. Salvo algunas flavonas localizadas en las alas de mariposa, se puede decir que no se encuentran en los animales.

El número de flavonoides descritos en la literatura es causa de disparidad entre diferentes autores; alguien señala que son 800 (17), otro afirma que son 900 (15) y un tercero dice que son 2000 (40), si se consideran los glicósidos de las especies.

Se identifica a los flavonoides dentro del grupo de los fenoles con dos anillos aromáticos, los cuales se caracterizan por tener una unidad de diarilpropano ($C_6-C_3-C_6$):

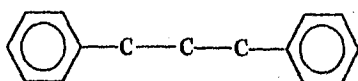


FIGURA 2.4.

Y se clasifican según la estructura del compuesto unido a la molécula en C_3 , que puede ser oxígeno, formando un anillo de pirano, dando lugar a la mayoría de las especies químicas comprendidas dentro de esta familia. También se generan diferentes patrones a partir de la adición de grupos hidroxilo a la estructura básica flavonoide.

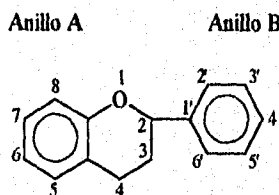


FIGURA 2.5.

Los dos anillos de benceno se dibujan en el mismo plano; en el caso de las flavonas, flavonoles, chalconas y antocianidinas, los anillos pueden estar en el mismo plano, pero en las leucoantocianidinas, flavonoles y flavononas, el anillo oxigenado tiene probablemente la configuración de semicadena recta y los anillos de benceno no están en el mismo plano.

TABLA 2.3. CLASIFICACION DE LOS FLAVONOIDES.

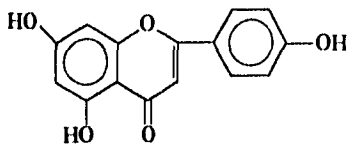
COMPUESTO FLAVONOIDE	EJEMPLO
(I) FLAVONA	Apigenina
(II) AURONA (BENZALCUMARONA)	Aureusidina
(III) CHALCONA	Buteína
(IV) FLAVANONA	Naringina
(V) FLAVONOL	Kaempferol
(VI) FLAVANONOL	Aronadredina
(VII) FLAVAN-3,4-DIOL (LEUCOANTOCIANIDINA, PROANTOCIANIDINA, CATEQUINA)	Melacidina
(VIII) ISOFLAVONA	Genisteína

COMPUESTO FLAVONOIDE	EJEMPLO
(IX) DIHIDROCHALCONA	Floretina
(X) BIFLAVONILO	Amentoflavona
(XI) ANTOCIANIDINA	Petunidina
(XII) NEOFLAVONA	Calofilólida

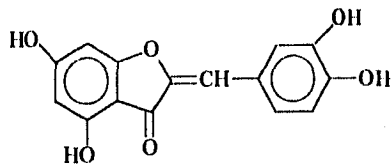
La mayoría de los flavonoides suelen encontrarse en la naturaleza como glicósidos, es decir, compuestos asociados a unidades de azúcar. Cabe señalar que se designan como glucósidos a los compuestos que tienen glucosa; los azúcares diferentes de ésta originan los glicósidos, término que se ha preferido en este caso para referirse en términos generales a los flavonoides con unidades de azúcar, siendo éstas, frecuentemente, glucosa y ramnosa; se han identificado, adicionalmente, galactosa, arabinosa, xilosa, gentiobiosa, rutinosa, apiosa e incluso, ácido glucurónico. Las posiciones de sustitución para los azúcares son 7, 5, 4', principalmente, y 7, 4', y 3'. También pueden tener sustituyentes acilo.

La forma en que se clasifican los flavonoides varía con los autores en diferentes textos. Se prefirió, en el caso presente, elegir la clasificación más desglosada.

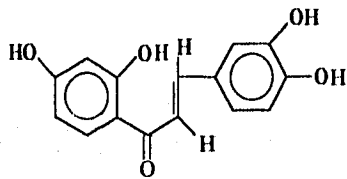
La figura 2.6. ilustra ejemplos de flavonoides típicos.



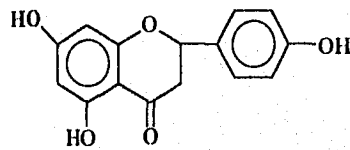
(I) Apigenina



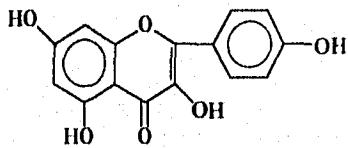
(II) Aureusidina



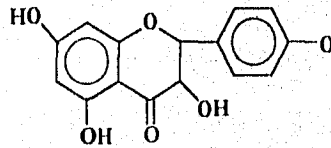
(III) Butcina



(IV) Naringina

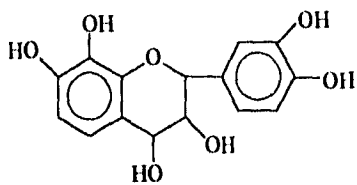


(V) Kaempferol

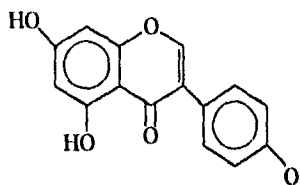


(VI) Aromndendrina

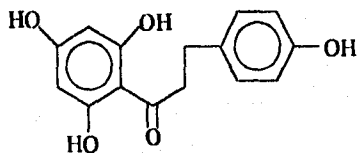
FIGURA 2.6.



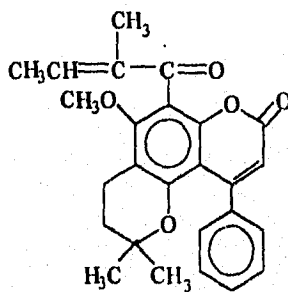
(VII) Melacidina



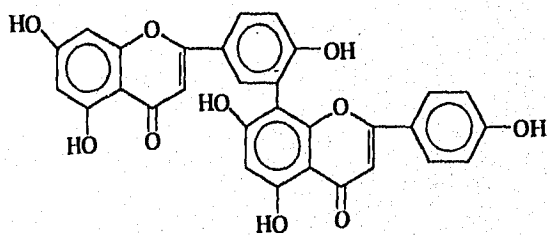
(VIII) Genisteína



(IX) Floretina



(XII) Caloflóida



(X) Amentoflavona

(CONTINUACION)

Cabe señalar que las designaciones de los compuestos anteriores también presentan ligeras variaciones. Se puede encontrar que la genisteína se clasifica como "isoflavanona" (17) y que el grupo de las leucoantocianidinas se nombra como "proantocianidinas"; para los propósitos de este trabajo, se optó por definir a las leucoantocianidinas como los monómeros del flavan-3,4-diol, y a los polímeros de esta estructura corresponde el segundo nombre propuesto, en acuerdo con Fennema (17). Y es este mismo autor quien señala a la catequina y la epicatequina como formas trans y cis del flavan-3,4-diol, siendo ésta la estructura básica, a diferencia de un segundo autor que presenta a la catequina como otra categoría de los flavonoides (12). Como se aprecia, diferentes autores presentarán sus clasificaciones tan compactas o desglosadas como les resulte más apto para sus fines.

Euler y Alam (16) reportaron el aislamiento y caracterización del kaempferol y el glicósido de éste, kaempferitrin ó kaempferol-3,7-diramnósido, a partir de *Justicia spicigera*.

El grupo de las antocianidinas será enfocado en una sección separadamente del resto (sección 2.4.8.). Recuérdese: la antocianidina que se presenta en forma de glicósido se llama antocianina, siendo éste el caso más frecuente en la naturaleza.

2.4.4. PROPIEDADES DE LOS FLAVONOIDES.

Se han encontrado diversas funciones donde parecen tener un papel importante estos compuestos; sin embargo, no es posible asegurar, en rigor, dicho papel. Mabry y Ulubelen (30) citan los siguientes ejemplos:

A. Fungicidas. Parece existir una relación entre la presencia de compuestos fenólicos y la resistencia de las plantas contra los virus y hongos. La presencia de apigenin 7- y 4'-glucósido, entre otros flavonoides, se ha asociado con la resistencia a ocho especies de *Pyrus*.

La naringina, nobiletina, tangeritina y 5,4'-dihidroxi-6,7,8,3'-tetrametoxiflavona protegen las hojas de ciertas plantas cítricas contra un hongo llamado *Deuterophoma tracheiphila*. Por otra parte, se cree que la actividad fungicida de los flavonoides contribuye a la durabilidad de la madera.

B. Actividad antidiarreica. La presencia de galangina, miricetina, kaempferol, quercetina y ácido gálico en los frutos de *Comptonia peregrina* parecen ser responsables de las propiedades antidiarreicas atribuidas a dicho fruto, usado en Europa central desde el siglo XIX.

C. Actividad estrogénica. Se registró un caso de disminución de nacimientos de ovejas en Australia. Se encontró que la causa fue la presencia de genisteína en los tréboles (*Trifolium subterraneum*). Las isoflavonas son similares estructuralmente a ciertos estrógenos; una mezcla de hesperidina fosforilada sintéticamente produce un efecto definitivo de infertilidad en algunas ratas.

D. Actividad contra moluscos. La 2',4'-dihidroxi-3',6'-dimetoxichalcona presente en el vegetal *Polygonum senegallense*, nativo del Este africano, se usa para combatir a los moluscos en Kenia.

E. Antitumoral. Los flavonoles eupatina y eupatoretina, y la flavona eupatilina contenidos en *Eupatorium semiserratum* presentaron un efecto citotxicológico moderado cuando se probaron en pacientes con cierto tipo de carcinoma.

F. Actividad sobre los insectos. 6-Metoxiluteolin-7-ramnósido estimula el apetito del insecto *Agasicles beetles*.

G. Nuevos edulcorantes. La dihidrochalcona de la naringina y la neohesperidina (y otras dihidrochalconas sintéticas) tienen un alto potencial como endulzantes comerciales. La naringina está presente en altas proporciones en subproductos cuyo origen sea el procesamiento de cítricos. La dihidrochalcona sintetizada a partir de la naringina es 1000 a 2000 veces más dulce que la sacarosa, pero su uso está aún a prueba.

H. Copigmentos. Sustancias como los glucósidos de la quercetina muestran un efecto de copigmentación relacionado con la adsorción característica de los cianidin-glucósidos, entre otras antocianinas. Esto se puede apreciar en el caso del vegetal *Centaurea cyanus*.

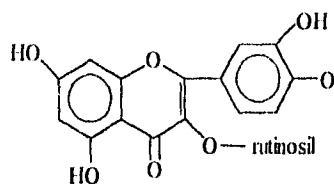
I. Actividad antiinflamatoria. En 1936 Szent-Gyorgyi observó que ciertas condiciones patológicas se caracterizaban por el incremento de la permeabilidad o fragilidad de las paredes capilares y que se las podía curar por medio de extractos de limón; así, se denominó al factor causante de la resistencia de las paredes capilares como "vitamina P"; trabajos posteriores dieron por resultado contradicciones, lo que motivó el abandono de la investigación en torno a la supuesta vitamina.

Se acuñó el término de bioflavonoides a aquéllos flavonoides con actividad biológica. A partir de 1948 se incrementaron los reportes sobre el uso terapéutico de los flavonoides cítricos; se encontró que separando una mezcla de éstos en fracciones de metanol, acetato de etilo y agua, 65 % de la actividad antiinflamatoria se detectó en la fracción acuosa. Los flavonoides cítricos complejos exhiben una actividad inhibidora más pronunciada que en el caso de la cortisona y los ejemplos son la hesperidina y naringina.

Ungar reportó el resultado de un bioensayo basado en la medición directa de una formación edémica, que consistió en demostrar la inhibición a la permeabilidad capilar causada por los extractos de la piel de cítricos. Otros investigadores asocian la actividad de ciertos bioflavonoides al sistema circulatorio; edemas cerebrales y cierto tipo de hemorragias fueron reducidos significativamente en ratas al administrárseles 50 mg/Kg de derivados de rutina o hesperidina

Un medicamento llamado Essaven contiene la chalcona metilada de la hesperidina, junto con otros derivados de flavonoides; se emplea en casos de hinchazón producida por golpes.

La β -hidroxietilrutina se usa extensamente para tratar hemorroides, cataratas, venas varicosas y otros casos de problemas relacionados con la fragilidad capilar. En la India se obtiene rutina a partir de las flores -muy ricas en dicha sustancia- de una leguminosa, *Sophora japonica* L.



Rutina

FIGURA 2.7.

J. Agentes antihepatotóxicos. Se han atribuido propiedades medicinales al extracto acuoso de los frutos de cierto tipo de cardo, *Silybum marianum L.*, por más de 2000 años. El principio activo es una mezcla de flavanoles con otras sustancias, generando unos compuestos designados como silibina, silidianina y silicristina (figura 2.8), llamando silimarinas al conjunto de ellos. Los productos comerciales que contienen silimarinas (Legalon, por ejemplo) tienen un efecto estabilizador en la membrana exterior hepática y previene la acción de varias toxinas en el hígado. También parecen activar la regeneración celular de ese órgano.

K. Agentes espasmolíticos. 7,4'-dihidroxi flavanona-4'-glucósido, proveniente de *Glycyrrhizae radix*, por sí solo no tiene efectos espasmolíticos, salvo si se trata de su aglicona y la chalcona obtenida de aquélla. La luteolina y sus derivados también acusan actividad espasmolítica.

Otros aspectos relevantes sobre las propiedades de los flavonoides son su contribución a la astringencia del té en polvo, la actividad desodorizante y desinfectante de locales; se cree que pueden funcionar como antioxidantes de grasas y

aceites, por su carácter polifenólico y su capacidad de secuestrar metales. Se ha propuesto que los flavonoides pueden ser inhibidores de la respiración y la fotofosforilación; algunas isoflavonas parecen actuar en el descenso del nivel de colesterol (40).

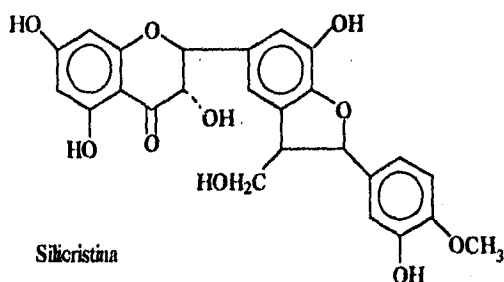


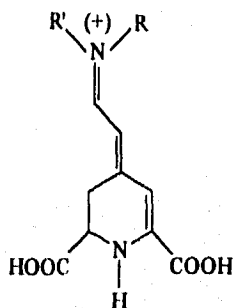
FIGURA 2.8.

2.4.5. DERIVADOS DE LA 1,7-DIAZOHEPTAMETINA.

Dentro de esta categoría se presentan las especies químicas conocidas como betalainas. Estos pigmentos se encuentran solamente en 10 familias de *Centrospermae*, de las cuales la mejor conocida es la remolacha roja o betabel (*Beta vulgaris*). También están presentes en los compuestos hidrosolubles del jugo celular de la acelga, cierto tipo de higos, la tuna roja; en algunas flores, como las del amaranto y las bugambilias. Estos pigmentos se hallan en las vacuolas. Se conocen unos 70 compuestos, todos hidrosolubles, es decir, como glicósidos, los cuales se forman con unidades de glucosa, ácidos como el glucurónico, caféico y ferúlico asociadas a la estructura principal, generando distintos patrones; también se encuentran naturalmente

en forma acilo, presentando estructuras complejas. Se han identificado los ácidos malónico, ferúlico, p-cumárico, sinápico y 3-hidroxi-3-metilglutárico unidos a la porción azúcar del glicósido.

Las betalaínas se derivan de la 1,7-diazoheptametina y se clasifican en dos grupos: betacianinas, que son pigmentos rojos, y betaxantinas, de color amarillo.

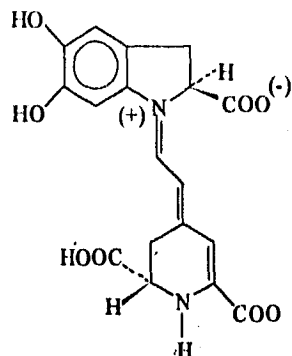


R y R' = H ó sustituyente aromático

1,7-Diazoheptametina

FIGURA 2.9.

A. Betacianinas. La más estudiada es la que se encuentra en el betabel, cuyo nombre es betaína, que representa el 75 a 95 % del total de pigmentos. La betanidina es la aglicona correspondiente. En los últimos años, se ha investigado a la amarantina, proveniente del amaranto (*Amaranthus tricolor*), la cual se ha usado en ciertos países para colorear alimentos.



Betanidina

FIGURA 2.10.

B. Betaxantinas. De éstas, se han identificado dos en el betabel: la vulgaxantina I (figura 2.11) y vulgaxantina II. Bajo condiciones alcalinas y en presencia de glutamina o ácido glutámico, se puede convertir la betanina en vulgaxantina.

La betanina puede transformarse y perder su coloración bajo la influencia de factores como el pH, temperatura alta, , oxígeno, la luz y el medio acuoso. En general, su estabilidad al calor está en función de la acidez y del oxígeno disuelto en el medio; los valores de pH de 4 a 6 son favorables y resiste tratamiento térmico en ausencia de este gas.

Otro mecanismo de decoloración de la betacianina y betaxantina del betabel es por la acción enzimática cuyo máximo se alcanza a $\text{pH} = 3.4$; se cree que la peroxidasa es la responsable de esta modificación. Todas las reacciones se aceleran por la acción catalítica de algunos metales, principalmente el cobre (2).

Se ha propuesto emplear betalaínas en los alimentos, los cuales se restringen a productos tales como gelatinas, bebidas y postres en general, debido a las limitaciones de su estabilidad. También se ha sugerido utilizarlas en productos cárnicos, como embutidos, debido a que los nitritos han causado controversia por su implicación en la síntesis de nitrosaminas; se considera que las betalaínas mezcladas con sorbato de potasio pueden sustituirlos.

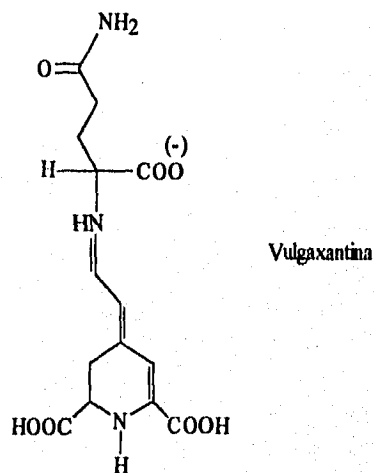


FIGURA 2.11.

2.4.6. DERIVADOS DE LA BENZOFENONA.

Dentro de esta categoría se clasifican dos tipos principales: las quinonas y xantonas. Como se comprenderá, la estructura básica de estos compuestos es la de la benzofenona:

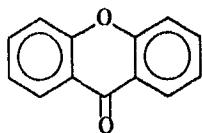


FIGURA 2.12.

A. Quinonas. Constituyen un grupo grande de pigmentos amarillos existentes en las plantas con flores, los hongos, líquenes, bacterias y algas. Se conocen más de 200 (17) y su color varía del amarillo pálido al negro. El subgrupo más grande es el de las antraquinonas, algunos de cuyos miembros se han utilizado durante siglos como colorantes naturales.

Una antraquinona típica es la emodina, que se encuentra ampliamente distribuida en hongos líquenes y plantas superiores:

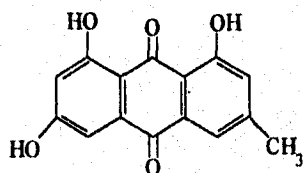


FIGURA 2.13.

Las naftoquinonas constituyen otro subgrupo más pequeño de compuestos, aproximadamente 20 (17).

La juglona, responsable en parte del color de la cáscara de la nuez es un ejemplo típico:

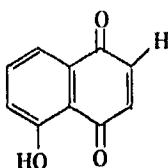


FIGURA 2.14.

Tanto las antraquinonas como las naftoquinonas se encuentran en el reino vegetal y en el animal. Las primeras -en los vegetales- se presentan como glicósidos, ordinariamente, las naftoquinonas no.

Un tercer subgrupo singular sería el denominado como naftacenoquinonas (17), pigmentos rojos limitados sólo a las actinomicetales, y están estrechamente relacionados con los antibióticos del tipo tetraciclina. Finalmente, hay otras especies comprendidas dentro de este grupo: fenantraquinonas, isoprenoidequinonas y otras estructuras complejas.

B. Xantonas. Se conocen unos 20 pigmentos amarillos correspondientes a esta categoría, que se han confundido con quinonas y flavonas (17). También se les ha empleado como colorantes desde la antigüedad. Un miembro típico es la mangiferina, glucósido que se encuentra en los mangos y se ilustra a continuación en la siguiente figura.

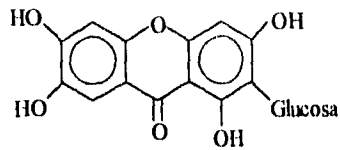


FIGURA 2.15.

2.4.7. COMPUESTOS FENOLICOS POLIMERICOS.

Los taninos son un grupo heterogéneo de compuestos polihidroxifenólicos cuyos pesos moleculares oscilan entre 600 y 2000 (12). Son incoloros o amarillo-café. En las hojas de plantas como roble, té y castaño se puede extraer gran cantidad de taninos, los cuales pueden constituir 75 a 80 % del material seco.

Se distinguen dos clases de taninos:

A. Hidrolizables. Son compuestos poliméricos complejos, que a su vez se dividen en galotaninos, cuando tienen ácido gálico, por ejemplo los taninos Turco (*Quercus infectoria*) y de zumaque (*Rhus coriaria*). La otra categoría es la de los elagitaninos, polímeros del ácido elágico, siendo los mirobalanos (*Terminitia chebula*) un ejemplo típico.

B. No hidrolizables o condensados. Generalmente son dímeros de otros flavonoides, principalmente del tipo flavan-3,4-diol.

Dentro de las características físicas de los taninos están su solubilidad en agua, alcohol, acetona y piridina, siendo insolubles en disolventes como éter o cloroformo. Los taninos hidrolizables se usan en el curtido de pieles. Las semillas de

uva son la mejor fuente de obtención de oenotánicos, que se usan en la fabricación del vino, ya que tienen propiedades antioxidantes y los protegen.

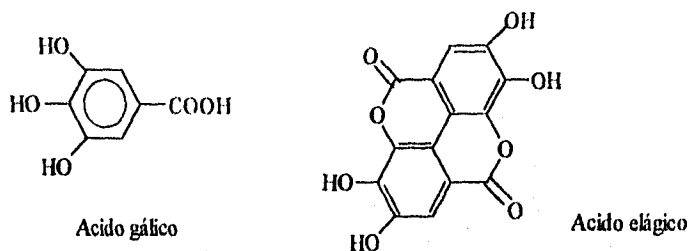


FIGURA 2.16.

En general, los taninos sirven de sustrato en reacciones de oscurecimiento enzimático, cuyo mecanismo de acción no se ha comprendido del todo bien, en el caso de productos como el café y el cacao; son responsables de la astringencia de ciertos frutos inmaduros, debido a que tienen la propiedad de reducir las características de lubricación de la saliva, pues precipitan las proteínas y glucoproteínas que contiene ésta.

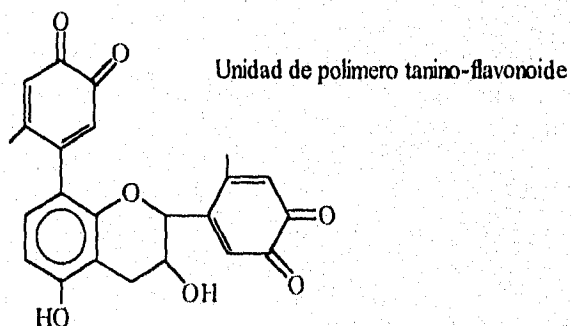


FIGURA 2.17.

2.4.8. ANTOCIANIDINAS.

Estos pigmentos son los responsables de los colores rosa, rojo, naranja, violeta y azul de diversos frutos, hojas y flores de las plantas superiores. A semejanza del resto de los flavonoides, las antocianidinas están contenidas en los órganos llamados vacuolas, y por tanto en la savia celular. Su presencia se ha detectado en unos cuantos casos de musgos y en frondas de helechos jóvenes, es decir, sólo en los hongos no se ha registrado la traza de estas sustancias. En algunas flores se ha estimado que constituyen el 30 % en peso del material seco.

Comparten muchas de las características propias de los flavonoides y, por lo tanto, los métodos de purificación y aislamiento que se van a presentar en esta sección pueden ser válidos para aquéllos, en casos específicos.

A. Estructura. Las antocianidinas son cationes oxonio, donde existe un oxígeno trivalente; la estructura base de estos compuestos es el ion denominado flavilio:

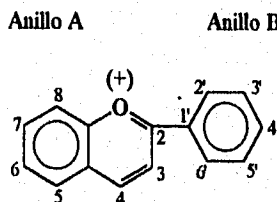


FIGURA 2.18.

Como se advierte, esta entidad es enteramente similar a la estructura propuesta para los flavonoides.

Normalmente, las antocianidinas se presentan en la naturaleza en la forma de glicósidos o antocianinas. Los azúcares que se encuentran unidos a la antocianidina suelen ser glucosa, ramnosa y galactosa, frecuentemente, pero también se presentan xilosa, fructuosa, rutinosa, gentiobiosa, arabinosa, soforosa e inclusive, sambumbiosa; estas unidades se unen a la aglicona por un enlace β -glucosídico y las posiciones de sustitución suelen ser 3, principalmente, 5 y 7 en segundo término. Los 3,5-diglicósidos son los más comunes en la práctica. 3, 7 y 7-glicósidos se hallan raramente, de igual forma que en las posiciones 3' o 4'.

No se han descrito antocianinas con cuatro unidades de azúcar, pero hay cierta evidencia de su existencia. Se ha registrado una antocianina con cinco moléculas de azúcar y cuatro componentes acilo (17).

También pueden presentarse sustituyentes acilo, generando estructuras cada vez más complejas; esterificadas a la molécula de azúcar se han hallado una o más moléculas de ácido p-cumárico, ferúlico, cafeico, malónico, p-hidroxibenzoico, p-hidroxicinámico, vanillico o acético. Los taninos presentes en el extracto natural con antocianinas pueden causar problemas de interacción si existen otros hidrocoloides en aquél. Para efectos de coloración en productos comestibles gelatinosos, es común que los taninos precipiten (10). Por otra parte, la metilación en el anillo B se restringe a las posiciones 3' y 5'.

Por último, es necesario mencionar que en la naturaleza se halla frecuentemente a las antocianinas en forma de cloruros -en adición con el carácter de glicósidos-, y

entonces se les denomina como sales de flavilio (18), pirilio (44), ó mas exactamente sales de fenil-2-benzopirilio (10).

La principal variación se establece entonces en la naturaleza del azúcar, el número de unidades de éste y la posición de sustitución. Esta variación será más drástica en cuanto sean más complejos los sustituyentes. Debido a que las antocianinas presentan la dualidad glicósido-sal, son los compuestos más hidrosolubles dentro del conjunto de flavonoides. En las tablas B, C.1. y C.2. del Apéndice I se podrán hallar constantes físicas para las antocianinas y sus agliconas que a continuación serán expuestas.

TABLA 2.4. ANTOCIANIDINAS.

ANTOCIANINA	AGLICONA	GLICOSIDO	FUENTE
Pelargonina	Pelargonidina	3,5-diglucósido	<i>Pelargonium zonale</i>
Cianina	Cianidina	3,5-diglucósido	<i>Centaurea cyanus L.</i>
Violanina Delfinina	Delfinidina	3- ramnoglicósido	<i>Viola tricolor L.</i>
Peonina	Peonidina	3,5-diglucósido	Peonia roja
Petunina	Petunidina	3,5-diglucósido	<i>Petunia hybrida</i>

ANTOCIANINA	AGLICONA	GLICOSIDO	FUENTE
Oenina	Malvidina	3-glucósido	Uva morada
Hirsutina	Hirsutidina	3,5-diglucósido	<i>Primula hirsuta</i>
Gesnerina	Apigenidina	5-glucósido	<i>Gesneria spp</i>

Las primeras seis especies son las más comunes en la práctica, en tanto que las restantes se hallan raramente; de éstas, se registran también la rosidina, luteolinidina, siringidina (35) y carajuridina (12). De hecho, las antocianidinas suelen tener tonalidades rojas con sus variantes, en tanto que sustancias como la apigenidina, luteolinidina y tricetinidina son de color amarillo, siendo casos excepcionales.

Mazza y Brouillard (32) afirman que las antocianidinas amarillas -en la figura adyacente- son los ancestros químicos de las antocianidinas rojas y púrpuras.

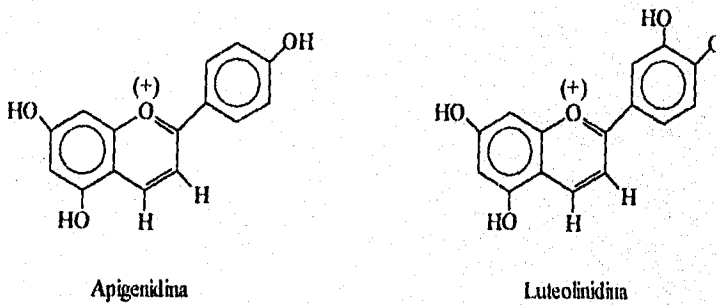


FIGURA 2.19.

El nombre común de las antocianinas y sus agliconas se adjudica a partir de la fuente donde se les aisló por primera vez, tal como se aprecia en la tabla 2.4.

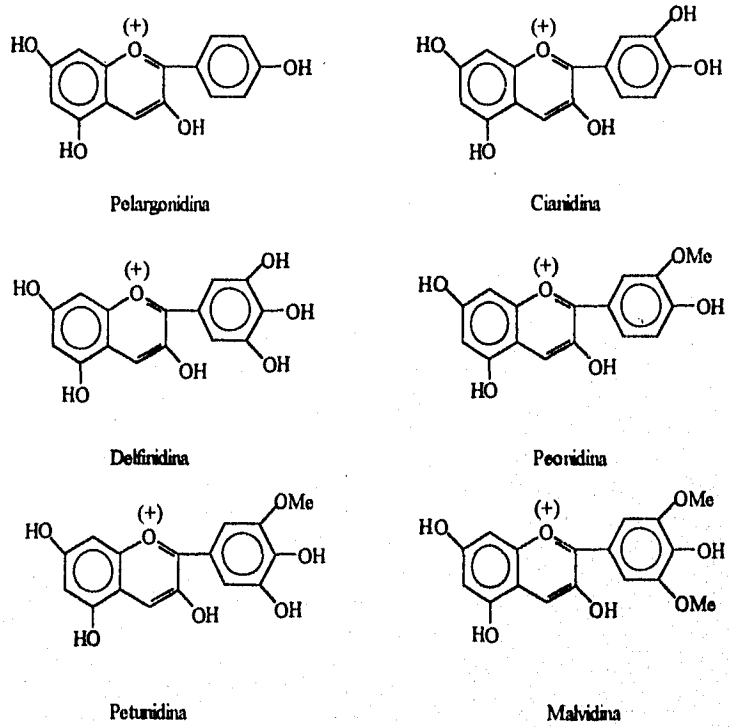


FIGURA 2.20.

Se advierte, a partir de los esquemas precedentes, que los sustituyentes en el anillo B generan las diferentes especies de antocianidinas

En base a la exposición anterior, se puede establecer la siguiente regla general: los sustituyentes metoxilo incrementan la tonalidad roja en las antocianidinas, en tanto

que la hidroxilación la incrementa hacia el azul. Esto se traduce en un efecto batocrómico en el máximo de absorción. Lo anterior se cumple cuando se tiene el pigmento puro.

Sobre el número de estos compuestos, se afirma que son aproximadamente 150 antocianinas abundantes en la naturaleza y alrededor de 20 antocianidinas identificadas (2).

B. Usos e importancia de las antocianinas. Estos pigmentos comparten las propiedades señaladas para los flavonoides. Bruneton (5) afirma que inducen un aumento de la regeneración fisiológica de la púrpura retiniana. Por electroretinografía se ha demostrado que aceleran la adaptación de la retina a la visión nocturna.

Compuestos atóxicos y que no presentan incompatibilidad, se utilizan como colorantes en fármacos y alimentos (véase tabla H del Apéndice I). De los primeros, se pueden citar drogas obtenidas del arándano (*Vaccinium myrtillus L.*), grosellero negro (*Ribes nigrum L.*) y de la vid (*Vitis vinifera L.*), en donde el principio activo lo constituyen entidades antociánicas.

La función de las antocianinas en las plantas sigue siendo incierta. Se ha sugerido que probablemente están involucradas con la respiración (11). Por otra parte, los colores de las flores atraen insectos, los cuales realizan la polinización. El color de las hojas en el otoño es generado por la acción conjunta de las antocianinas y los carotenoides.

C. Efecto del pH. El catión flavilio (I) es deficiente en electrones y, en consecuencia, muy reactivo. Es estable solamente a valores de pH muy bajos. Con el

incremento del pH se transforma progresivamente en el compuesto incoloro cromenol (II), o pseudo-base carbinol; en el intervalo de pH entre 6 y 8 se produce, por la formación de quinoides (III) y bases iónicas anhidras (IV), una intensificación en el color.

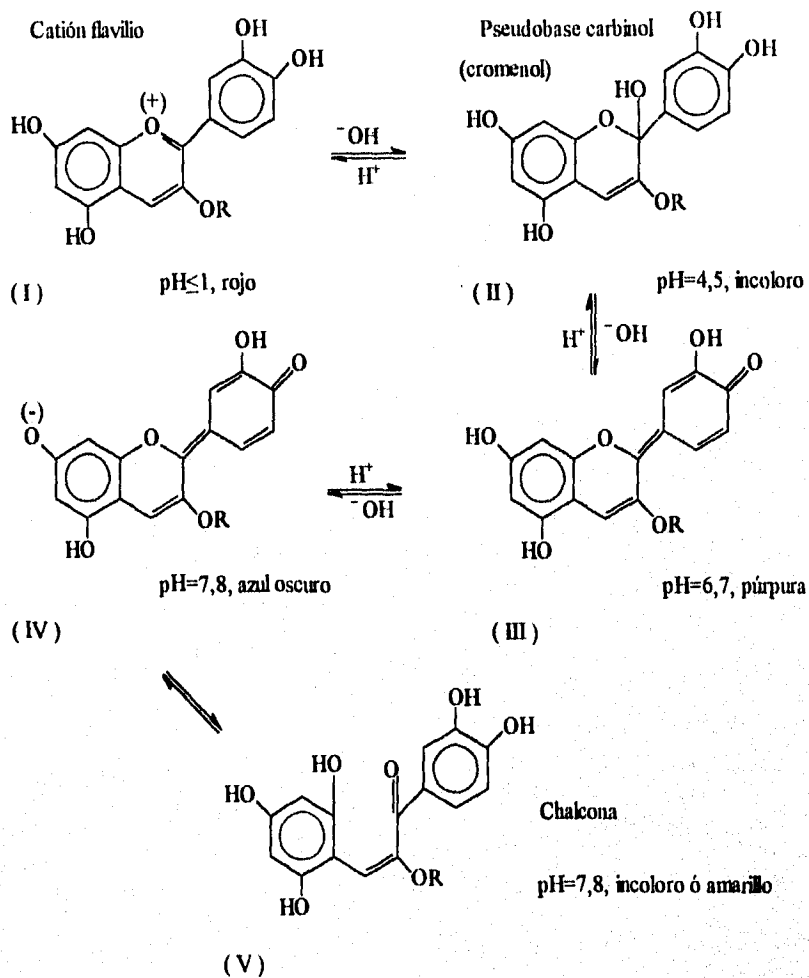


FIGURA 2.21.

A pH de 7 a 8 el compuesto (IV), por apertura de uno de los anillos, se transforma en chalcona (V), de color amarillo o incoloro .

Por lo expuesto, el color de estos pigmentos cambia de acuerdo al pH y el caso más común es que a pH bajo el color predominante es el rojo, y a pH alto, el azul, o bien, el amarillo, color típico de los flavonoides a pH alcalino. Counsell (10) propone una serie de valores de pH y sus respectivos máximos de absorción en el espectro visible asociados al comportamiento del Polvo de Antocianina E163 (tabla F del Apéndice I).

La estabilización del color a pH más alto es posible sólo en presencia de iones metálicos de alta valencia, como Al^{3+} y Fe^{3+} , por formación de complejos de color azul oscuro.

Las antocianidinas libres se descomponen a valores altos de pH, pasando por el estado de cromenoles (II) y α -dicetonas (VI) hasta dar aldehídos (VII) y ácidos carbonílicos (VIII).

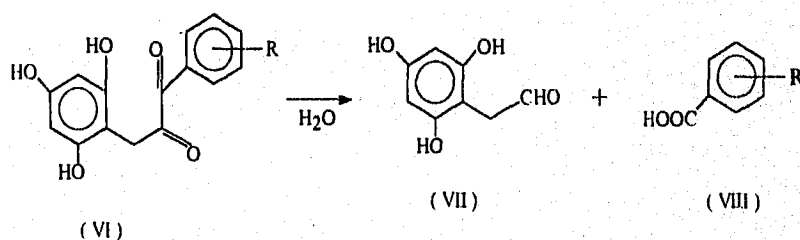


FIGURA 2.22.

Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de antocianinas que muestran una respuesta diferente al pH. Se trata de compuestos que tienen sustituciones azúcar en el anillo B del orden de 2 o más grupos acilo. Un compuesto de este tipo (tricafeoilcianidín 3,7,3'-triglucósido), se ha observado que tiene una estabilidad extraordinaria porque no se produce la forma pseudo-base carbinol debido al impedimento estérico de los grupos acilo. Cinco compuestos con sustituciones azúcar en el anillo B se han registrado hasta la fecha (17).

Citando el trabajo realizado por Mazza y Brouillard (32), se encontró que cierto tipo de antocianinas podían mantener su estabilidad hasta pH neutral debido a que presentaban una constante de acidez alta. Por su parte, Brouillard realizó un trabajo con una antocianina proveniente de *Zebrina pendula* (4), donde encontró una estabilidad excepcional cerca de pH neutro debido también a una constante de acidez grande y al impedimento estérico de grupos acilo, resultando condiciones desfavorables para que interactuaran nucleófilos -en particular el agua- sobre el flavilio.

D. Efecto de la temperatura. Se puede decir que la temperatura alta, en general, contribuye a la degradación de la antocianidina, y más pronunciadamente en adición a otros factores: oxígeno y pH, éste último es determinante. Debido a su acidez, la mayoría de las frutas que contienen antocianinas normalmente no experimentan cambios de color indeseables en el cocinado, salvo cuando el color es extraído por el agua. A nivel industrial, esto resulta inconveniente, ya que es necesario añadir otros aditivos para la retención del color.

E. Efecto del oxígeno y la luz. El oxígeno tiene un efecto negativo en la estabilidad de la antocianina, esto se aprecia sobre todo en los vinos. La velocidad de oxidación depende del pH de la solución, su temperatura y la concentración del pigmento. En la industria alimentaria no constituye un efecto de suma relevancia. Los productos que contienen antocianinas no parecen ser afectados por la luz solar (10) (26).

F. Reacciones de condensación. Se ha observado que la degradación de las antocianinas va acompañada de la del ácido ascórbico, de tal manera que en muchos casos la oxidación de la vitamina C implica una decoloración. También los azúcares reductores, sobre todo la fructuosa, parecen afectar al pigmento, porque se ha pensado que el monosacárido, a pH y temperatura elevados, se descompone en hidroximetilfurfural y en furfural, que son los que en realidad atacan a las antocianinas.

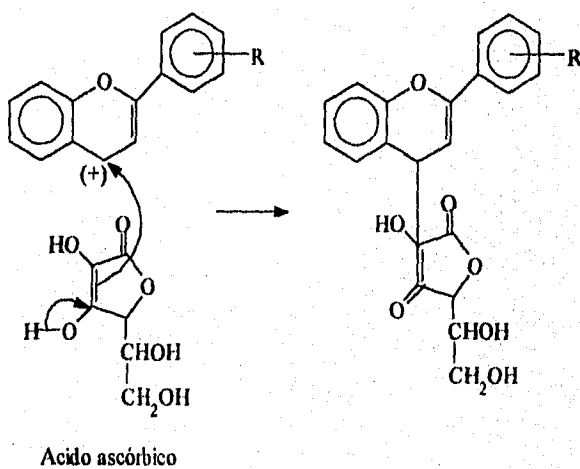


FIGURA 2.23.

Otras sustancias que degradan el color serían los aminoácidos y fenoles, entre otras, por medio de reacciones de condensación con los pigmentos, cuyos productos probablemente son muy complejos.

G. Reacción con SO₂. La adición de SO₂ conduce a la decoloración de las antocianinas, generando compuestos del tipo carbinol básico (IX) ó (X), mediante reacciones de adición simple en las posiciones 2 ó 4. El efecto es reversible, pues basta acidular a pH=1, calentar, o bien, agregar un compuesto carbonílico, etanal por ejemplo, para regenerar el color. Puesto que los compuestos del tipo (XI) no reaccionan con el SO₂, parece más probable que el compuesto formado sea el (X).

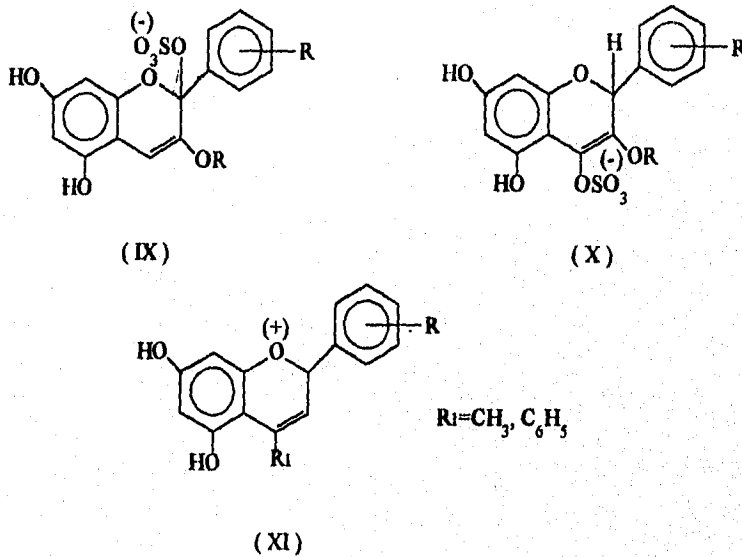
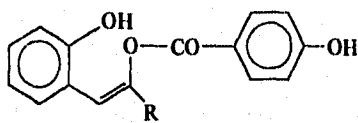


FIGURA 2.24.

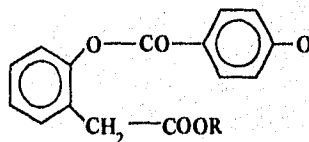
Esta reacción se verifica con los aditivos empleados en la conservación de los alimentos. Cabe indicar que estas mismas formas sulfónicas ejercen un efecto estabilizador sobre el enlace glicosídico y evitan la hidrólisis de la antocianina.

H. Reacción con peróxidos. Se ha sugerido que durante el proceso de descomposición de las antocianinas en presencia del ácido ascórbico, la autoxidación del H_2O_2 es el responsable de dicha degradación. Esto no ha sido del todo comprobado, pero no hay duda de que la estructura catiónica del flavilio es muy susceptible al ataque nucleofílico del peróxido.

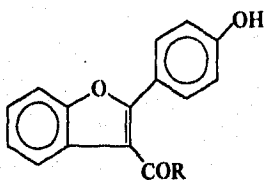
Estudios recientes conducen a proponer estructuras incoloras tales como benzoato-enólica (XII), benzoil-éster (XIII), fenilbenzofurano (XIV) o ceto-diol (XV), como productos resultantes de la acción del peróxido, dichas estructuras se representan a continuación:



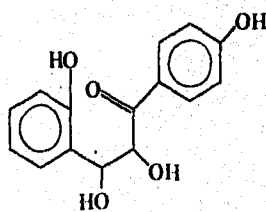
(XII)



(XIII)



(XIV)



(XV)

FIGURA 2.25.

I. Efecto enzimático. Las antocianinas pueden ser afectadas por la acción de enzimas endógenas o las que provienen de los hongos y que tienen actividad de β -glucosidasa (antocianidasa), que hidrolizan el enlace glicosídico en posición 3, produciendo la aglicona correspondiente, la cual es mucho más inestable que la antocianina.

Por tener estructuras fenólicas, estos pigmentos son atacados por las fenolasas; cuando existe catecol, la peroxidasa los degrada rápidamente, cuando aquél se transforma a o-quinona, oxidando a los pigmentos. Una vez más, el mecanismo de acción de las enzimas no ha sido enteramente esclarecido.

J. Complejos metálicos. Algunas antocianinas tienen grupos hidroxilo vecinales, lo que les permite formar complejos con metales.

Se observó que los pigmentos de antocianina rojos pueden aislarse de flores azules (azulejo o *Centaurea cyanus*) y esto condujo al hallazgo del fenómeno de copigmentación, o sea, la asociación de antocianinas con flavonoides amarillos y otros polifenoles; se encontraron complejos con metales como Al, Sn, Fe, Cu, Ca, Mg, Na y K y también con aminoácidos, proteínas, carbohidratos, pectinas, entre otros.

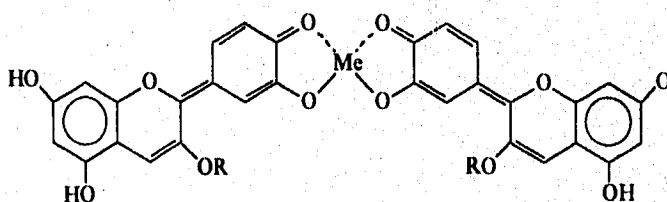


FIGURA 2.26.

Cuando se forman complejos con hierro, aluminio y estaño, éstos presentan una tonalidad azul, gris o gris-púrpura. Esta es la razón por la cual los alimentos que contienen antocianinas -principalmente las frutas- deben almacenarse en latas esmaltadas o laqueadas, de lo contrario, se presenta el fenómeno de corrosión.

Si la antocianina forma un quelato, se produce un efecto estabilizador del color.

Un trabajo de sumo interés es el que desarrolló Kondo y colaboradores (27), trabajando con las flores azules de *Commelina communis*; luego de aislar el pigmento azul responsable del color de los pétalos de dichas flores procedieron a preparar complejos con cadmio (Cd^{2+}), y también con otros metales, obteniendo la estructura cristalina de tal complejo, mediante rayos X. Realizaron la síntesis de un complejo con magnesio, la antocianina en cuestión -malonilawobanina, una delphinidina- y flavocommelina, una flavona. Finalmente, sus estudios los llevaron a concluir que el conjunto de los componentes antes señalados constituye el pigmento azul de las flores en investigación. Afirmaron que la estabilidad y comportamiento de tal compuesto se explicaba en función de tres fenómenos: acomplejamiento, a quien se debía la estabilidad, autoasociación y copigmentación. También establecieron que la posición quelante es la orto, para los grupos hidroxilo del anillo B de la antocianina. Por último, esta investigación es la primera en reportar un estudio cristalográfico de complejos de antocianina.

K. Métodos de aislamiento y caracterización. En tabla 2.5. se presenta un esquema general, que dará idea de los puntos básicos que implica este tópico.

TABLA 2.5 METODOS DE AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN.

METODO	CLASE
Extracción	Sólido-líquido
	Líquido-líquido
Cromatografía	Capa fina
	Papel
	Columna
	Gas
Espectroscopía	Visible y ultravioleta
	Resonancia
	magnética nuclear

K.1. Extracción. Las antocianinas son hidrosolubles y, por lo tanto, se disuelven en disolventes polares. La forma tradicional de extraer estas sustancias es utilizar soluciones alcohólicas ligeramente aciduladas. Se trabaja con el material vegetal seco, de preferencia, y se sugiere emplear metanol, por tener un punto de ebullición bajo en relación a otros alcoholes superiores.

Cuando se trabaja con material fresco, es recomendable el uso de disolventes absolutos; si se tiene material seco o predominantemente leñoso es conveniente utilizar soluciones alcohólicas con agua, para facilitar la remoción de glicósidos. En el caso de las agliconas, se propone el uso de disolventes no polares como benceno, cloroformo.

En el caso de las antocianinas, se emplea una solución de metanol con 0-1 % de HCl ó algún otro ácido suficientemente volátil. La acidificación previene la oxidación y, como se recordará, garantiza la estabilidad de la especie. Se reporta el uso efectivo de alcohol amílico o bien el sec-butanol, este último demostró ser útil en la remoción de compuestos antocianicos en fase acuosa, a la cual se haya añadido NaCl ó MgSO₄.

El proceso normal de extracción se efectúa macerando el vegetal con el disolvente. En ciertos casos se sugiere utilizar el Soxhlet, pero esto implica el riesgo de emplear un exceso de calor, que podría degradar las sustancias involucradas. En la separación colectiva de flavonoides, se empleará un disolvente polar de los ya mencionados para extraer de una fase líquida con aquéllos en solución a las antocianinas.

Cuando ya se ha obtenido un extracto crudo, es recomendable realizar una extracción con fase sólida, a saber:

- Polivinilpirrolidona (PVP)
- Octadecilsilano
- Sephadex G-25
- Sephadex LH-20
- Poliamida
- Resinas de intercambio iónico
- Alúmina ácida

El método es simple. Una columna que sirva para realizar eluciones sucesivas con un disolvente apropiado para usarse con adsorbentes poliméricos y se tendrá la purificación requerida. El metanol acidulado es el disolvente sugerido para este caso.

El paso siguiente es el análisis del extracto crudo de antocianinas, que se lleva a cabo normalmente por medio de la cromatografía.

K.2. Cromatografía. Se puede hechar mano de la cromatografía bidimensional en papel, o bien, la cromatografía de capa fina.

Harbone (22) es el autor que ha registrado el mayor número de antocianinas con sus respectivos valores de R_F , trabajando con PC (paper chromatography). En la tabla D del Apéndice I se encuentran valores experimentales correspondientes a esta técnica.

Por lo general, el cromatograma se corre primero con una mezcla acidulada alcohólica, por ejemplo:

n-butanol-ácido acético-agua, BAW (6:1:2 ó 4:1:5)

t-butanol-ácido acético-agua (3:1:1)

Al cabo de esto, se emplea ácido acético diluido (2-15 %). En casos de cromatografías bidimensionales se puede usar como segundo disolvente alcohol bencílico-alcohol terbutílico-propanol-agua (3:1:1:1). Otra mezcla es el llamado Forestal, agua-ác. acético-ác. clorhídrico conc. (30:10:3).

Cuando el cromatograma se ha secado, se puede someter a vapores de amoníaco concentrado y en seguida se examina con luz visible y después con luz UV de longitud de onda larga. Se sugiere aplicar un spray a base de 1 % de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ó $Al(NO_3)_3$ al 50 % en metanol o etanol antes de aplicar luz UV, ya que se acentúan las manchas

sobre el cromatograma; las antocianinas forman quelatos azules de enorme estabilidad. El número, la posición y los colores de las manchas se marcan con un lápiz. Para ilustrar este recurso experimental, obsérvese la figura 1 del Apéndice I.

Uno de los factores determinantes del R_f es el número de unidades de azúcar asociadas a la antocianidina, es decir, a mayor número de aquéllas se reduce el R_f en BAW y en BuHCl (n-butanol-ác. clorhídrico 2 M, 1:1); crece el valor del R_f si se trata en HCl al 1% (ác. clorhídrico conc.-agua, 3:97).

Las antocianinas se reconocen por los colores de las manchas en el papel: los glicósidos de pelargonidina son de color naranja, los de cianidina y peonidina son color magenta y los glicósidos de delphinidina son de color malva (22).

Cuando las antocianinas tienen elementos acilo, también se observa un cambio en el R_f y por el hecho de que, durante una nueva cromatografía de la muestra o bidimensional, da origen a dos manchas, debido que el grupo acilo es muy lábil. Véase el Apéndice I (tabla D) para apreciar el efecto antes mencionado.

El papel para cromatografía puede ser de diferentes tipos, por ejemplo, el papel filtro Whatman no. 3 (20) -el más común- o no. 1 (14); la bibliografía puede proporcionar más detalles (28).

La cromatografía de capa fina (TLC, thin layer chromatography) tiene cierta ventaja -en tiempo- sobre la PC. La desventaja de aquélla radica en la corta estabilidad del color y por la falta de control sobre el espesor de la fase estacionaria sobre la placa.

Las antocianidinas se separan sobre gel de sílice con una mezcla de acetato de etilo-ác. fórmico-ác. clorhídrico conc. (85:6:9). Las antocianinas pueden separarse

sobre celulosa o una mezcla de ésta y gel de sílice usando disolventes similares a los usados en PC.

Un tercer tipo de cromatografía es el designado como cromatografía de columna. Esta técnica ofrece, en general, una prominente ventaja sobre los otros tipos de cromatografía. Por ejemplo, la alúmina, es útil para separar antocianinas que tengan un solo grupo hidroxilo libre en el anillo B del resto con más de uno de éstos; se ha utilizado alúmina, celulosa, resinas de intercambio iónico y gel Sephadex en columnas abiertas con resultados negativos y, en cambio, la poliamida ha mostrado una buena retención, pero con una resolución pobre; los mejores resultados se han registrado con PVP.

Dentro de la categoría anterior, se distingue la técnica conocida por sus siglas en inglés como HPLC (high performance liquid chromatography) ó cromatografía líquida de alta resolución, la más utilizada en los últimos años. Permite la separación más exitosa de antocianinas y antocianidinas, siendo ejecutada bajo la modalidad de HPLC en fase reversa (RP-HPLC).

La RP-HPLC requiere de columnas con fases estacionarias tales como μ Bondapak C₁₈ o LiChrosorb RP-18. Esta técnica ofrece resultados excelentes en cuanto a sensibilidad y datos cuantitativos en un corto tiempo, relativamente. La HPLC en combinación con otros métodos auxiliares (electroquímicos, espectroscopía UV-visible, etc.) permite caracterizar a los pigmentos.

Los disolventes empleados -como se sospechará- son mezclas de diferentes componentes aciduladas:

-Agua-ác. acético-metanol (71:10:19)

-Combinaciones de 1-5 % de H_3PO_4 , 20 % ác. acético ó 20 % de acetonitrilo en agua

-Ac. Fórmico al 10 % (p/v)

Este último es el más usado en RP-HPLC. El pH es aproximadamente 1.9. Otros ácidos útiles son el trifluoroacético, e inclusive, el perclórico.

El promedio del tamaño de partícula para el empacado es normalmente de 3 y 10 mm. La fase estacionaria debe elegirse entre las convencionales según sea el indicio que se tenga sobre el tipo de pigmento a caracterizar (28).

Generalizando, se puede afirmar que el orden de elución de las antocianidinas en RP-HPLC, de acuerdo a la polaridad, en orden progresivo es

-delfinidina

-cianidina

-petunidina

-pelargonidina

-peonidina

-malvidina

No siempre es posible realizar una separación exitosamente. Cianidin 3-glucósido es virtualmente imposible de separar de cianidin 3-galactósido vía PC o cromatografía de columna.

La técnica de HPLC ofrece la ventaja de revelar las diferentes proporciones de las antocianinas presentes en una muestra. En el análisis de los vinos resultan de gran

utilidad los perfiles de antocianinas para clasificarlos geográficamente. El color del vino, en muchos casos, está asociado al tipo y cantidad de sus antocianinas.

Resta mencionar que la cromatografía de gas se ha empleado en casos aislados. Las antocianinas tienen una volatilidad reducida y requieren un tratamiento especial para someterseles a esta técnica. A pesar de ciertos experimentos muy exitosos, la estabilidad de los pigmentos implica un serio problema. Difícilmente es posible asegurar que no se han degradado. El empleo de cromatografía gas-líquido y la espectrofotometría de masas han sido reportados en el aislamiento de agliconas y azúcares.

K.3. Espectroscopía. Este es el recurso que sirve como apoyo y herramienta de caracterización de los pigmentos. Una inspección general sobre los flavonoides conduce a la tabla 2.6., donde se presentan datos típicos para este parámetro. Véanse, además, la tablas B y E, el artículo G y los espectros adjuntos del Apéndice I para ilustrar esta sección.

Sobre los valores descritos en la tabla anterior, es preciso recalcar que la absorptividad será afectada por el pH -en el caso de las antocianinas- y los datos bibliográficos coinciden en señalar que los máximos valores en el visible se han obtenido a $\text{pH} < 2$.

Normalmente, se emplea metanol ligeramente acidulado para obtener los espectros en el visible y UV. La adición de un álcali causa un efecto de desplazamiento en varios flavonoides. En algunos casos es posible usar sustancias de ese tipo como acetato de sodio y AlCl_3 , éste último con propiedades de agente quelante. Los cambios

en la longitud de máxima absorción (λ máx.) producidos por estos reactivos conducen a dilucidar patrones de hidroxilación, por citar un ejemplo. Las antocianinas contienen grupos hidroxilo en posición orto en el anillo B, que implica la formación de complejos con el aluminio; se tendrá entonces un desplazamiento en la λ máx.

TABLA 2.6. DATOS ESPECTRALES PARA FLAVONOIDES EN LA REGION DEL VISIBLE

FLAVONOIDE	LONGITUD DE ONDA DE MAXIMA ABSORCION (λ MAX. , nm)
Antocianinas	500-530
Flavonas y flavonoles	330-375
Chalconas y auronas	370-410
Flavanonas	250-300
Leucoantocianidinas y catequinas	280
Isoflavonas	250-290

Para la espectroscopía ultravioleta (UV), los valores típicos correspondientes a las antocianinas y sus agliconas oscilan entre 270 y 280 nm como λ máx. La información obtenida a partir de los espectros UV ordinarios es más rica cuando se

añade un agente de los ya mencionados anteriormente. En el caso de las antocianinas, cuando se añade un álcali, pierden su estabilidad.

Los espectros de flavonoides del tipo infrarrojo (IR) se han analizado y se encontró que los hidroxilos fenólicos absorben a $3300-3140\text{ cm}^{-1}$, los grupos carbonilo a $1660-1650$ en flavonas, flavonoles e isoflavonas y 1640 en las flavanonas. Las sales de antocianinas dan señales intensas a $3200-3100$ y $1720-1700$, y ancha a $1000, 1020-80\text{ cm}^{-1}$.

En cuanto a la técnica de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), al inicio de los estudios con flavonoides se encontró el obstáculo de su insolubilidad en los disolventes convencionales útiles para este tipo de espectroscopía, esto es, CCl_4 y CDCl_3 (cloroformo deuterado). Se encontró posteriormente que el trimetilsilil éter (TMS) de los flavonoides se disolvía en CCl_4 y que el hexadeuteriodimetil sulfóxido (DMSO-d_6) -disolvente polar- también resultaba útil para este fin.

La espectroscopía RMN se ha desarrollado notablemente a partir de 1980, aproximadamente. La literatura consultada reporta con más frecuencia datos de UV y visible. De hecho, no se encontró la generalización de los datos espectroscópicos RMN para caracterizar a las antocianinas y sus agliconas. Los TMS éter de los flavonoides, en general, presentan señales de $0-8.5\text{ p.p.m}$ (la escala δ relativa a TMS) pero la región más informativa desde el punto de vista de los sustituyentes sobre los anillos A y B es en el rango de $5.75-8.2\text{ p.p.m}$; para las agliconas de los flavonoides sin grupos metoxilo este es el único rango de absorción (20).

K.4. Otros métodos experimentales. Es conveniente sólo citar algunos métodos cuya relevancia es menor respecto a los antes señalados, pero que conforman el contexto de la química experimental de las antocianinas:

-La cromatografía a contracorriente (CCC, counter-current chromatography), similar en ejecución a HPLC.

-Electroforesis, cuyo principio es la naturaleza iónica del pigmento. Los resultados más importantes se han obtenido en papel.

-Precipitación de complejos, principalmente con acetato de plomo (15) (45), donde éste forma el quelato correspondiente. Otros agentes precipitantes son el ácido pícrico, acetato de potasio, piridina e hidróxido de bario (40).

K.5. Hidrólisis de antocianinas. La forma convencional de obtener las agliconas o antocianidinas es someter el material vegetal -fresco o seco- a ebullición en alcohol acidulado o bien una simple solución acuosa ácida.

Harbone (22) señala que el vegetal se calienta en una solución 2 M de HCl durante 40 min. a 100°C. Se tamiza el pigmento y se extrae con acetato de etilo para remover trazas de flavonoides. La fase acuosa se somete a calentamiento otros 3 min. a 80°C para eliminar el acetato de etilo. Se procede a extraer el pigmento con alcohol amílico y se concentra hasta sequedad.

En este punto ya se tiene la antocianidina, a la cual se puede analizar por cromatografía u otro recurso para su identificación.

C A P I T U L O 3

TRABAJO EXPERIMENTAL

3.1. OBSERVACIONES PRELIMINARES.

3.1.1. EL PUNTO DE PARTIDA: INDICIOS DE LA PRESENCIA DE UN PIGMENTO DE LA ESPECIE ANTOCIANINA.

Para iniciar este trabajo, se observó que *Justicia spicigera Schl.* tiene un colorante hidrosoluble, de tono rojo intenso y visualmente llamativo. Se realizó una búsqueda bibliográfica -la cual se presentó inicialmente en este trabajo- sobre la planta en cuestión y los diferentes tipos de pigmentos vegetales; esto fue útil para concluir que las antocianinas eran las que más se asemejaban al mencionado colorante hidrosoluble.

3.1.2. FORMA DE ADQUISICIÓN DEL VEGETAL.

El vegetal fue adquirido en el Mercado de Sonora de la Cd. de México, a granel, sin frutos ni raíces y fresco. Es posible encontrar ejemplares con flores durante la primavera y verano.

3.1.3. ASPECTO FISICO Y SOLUBILIDAD.

El vegetal tiene hojas y tallos verdes, éstos últimos de consistencia leñosa cuando son maduros y se aproximan a la raíz. Las flores son de forma tubular y angosta, con cinco pétalos soldados entre sí y de color naranja-rojizo.

Si se parte una hoja o un tallo con la mano no hay rastro de ningún pigmento que no sea clorofila.

El vegetal forma soluciones coloridas en agua, lo mismo en frío que en caliente, aunque en el primer caso es necesario macerarlo para que libere el pigmento fácilmente. Este presenta tonalidades que van del rojo intenso al rosa pálido, de

acuerdo a la concentración, con ciertos tonos azules, estos últimos a veces imperceptibles a simple vista. El olor de la solución es típicamente herbal.

El colorante también puede ser extraído con una mezcla de etanol-agua (1:1) en frío, macerando el vegetal; cuando se añade a éste acetato de etilo se obtiene una solución de color verde, y al evaporarse quedan residuos de aspecto graso, del mismo color, por lo que se presume la presencia de clorofila, fundamentalmente, en este extracto. Lo mismo sucede en el caso del hexano; se obtiene un extracto verde amarillento, cuyos residuos también presentan aspecto graso.

Por último, se aclara que en todos los casos se trabajó con el vegetal seco, triturando hojas y tallos separadamente. En las mediciones de pH se empleó papel indicador universal Merck.

3.2. PRUEBAS DE ESTABILIDAD.

3.2.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA.

PRUEBA A. 2 g de hojas y la misma cantidad de tallos se maceraron en 30 ml de agua fría -separadamente- hasta obtener unas soluciones intensamente coloridas; una vez filtradas ambas, se procedió a añadir agua al extracto así obtenido hasta un volumen de 200 ml, aprovechando el residuo vegetal separado mediante varias adiciones del líquido, en sendos vasos de precipitados. Utilizando una parrilla eléctrica, se calentaron ambas soluciones, hasta alcanzar el punto de ebullición a una temperatura de 95°C, aproximadamente, dejando transcurrir 10 minutos y deteniendo el proceso. Los vasos de precipitados se dejaron a la intemperie, destapados, durante 24 horas.

Se continuó calentando las soluciones remanentes hasta evaporar toda el agua, manteniendo el rango de temperatura entre 80 y 90 °C. Los vasos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se procedió a añadir agua fría al residuo contenido en ellos, en la misma cantidad hasta detectar algún cambio.

TABLA 3.1. PRUEBA A.

HOJA	<p>[1] Extracto acuoso de color rojo intenso a temperatura ambiente.</p> <p>[2] Después de concentrar el extracto mediante calentamiento, se observa un tono café-rojizo, muy intenso, en la solución.</p> <p>[3] Al evaporar toda el agua se observan residuos de color prácticamente negro en el fondo y paredes del vaso de precipitados.</p> <p>[4] Al agregar agua al residuo se observó la aparición del color rojo inicial, persistiendo material negro insoluble, aún agitando.</p>
TALLO	<p>[1] Extracto acuoso de color rojo a temperatura ambiente, de menor intensidad que el de hoja, comparativamente.</p> <p>[2] El extracto concentrado a la mitad del volumen inicial presenta una tonalidad roja, similar a la precedente.</p> <p>[3] y [4] aplican.</p>

CONCLUSION. El colorante resistió el calor y los residuos de color negro pueden ser azúcares y material orgánico calcinados. Cuando se ha concentrado el extracto acuoso y después del calentamiento, es de creer que la tonalidad café-rojiza

(observación [2] para la solución de hojas) obedece a la presencia de taninos. Cualitativamente, éstos parecen estar en mayor proporción en las hojas que en los tallos.

PRUEBA B. En esta prueba se elaboraron soluciones de hojas y tallos en la forma ya descrita en la sección precedente, nuevamente 200 ml de cada material en sendos vasos de precipitados. Se tomaron muestras de 10 ml de cada solución en tubos de ensayo, para que sirvan como testigos, asignándoles la letra T, la letra H, en el caso de la solución de hojas, y la letra t, para distinguir a los tallos. En una parrilla eléctrica se calentaron ambas soluciones hasta una temperatura entre 45 y 50 °C, tomándose muestras de 10 ml en tubos de ensayo, etiquetados con el número 1. Una vez que la temperatura alcanzó los 70 °C se tomó otro par de muestras, las número 2. Finalmente, se dejó que los extractos alcanzaran la ebullición, aproximadamente a 95 °C, y al cabo de 10 minutos se suspendió el calentamiento. Se tomaron las muestras correspondientes, asignándoles el número 3. Todas las muestras fueron expuestas al medio ambiente durante 48 horas.

TABLA 3.2. PRUEBA B.

Tt	[1] La solución fue de color rojo. Al cabo de 2 días presenta una capa sobrenadante de color blanco, en cuya cima se nota una capa mas tenue de color rojo. El resto de la solución es ligeramente turbia y blanquecina. pH≈5.
It	[2] Aplica observación [1].

2t	[3] Aplica observación [1], salvo el pH≈6.
3t	[4] Inicialmente la solución presentó un color rojo con tintes azules. Al final de 2 días, la solución aún conserva el color, pero ya hay traza de una banda superior, como una fase más ligera, de color rojo. pH≈6.
TH	[5] La solución presentó un color rojo intenso. Después de 2 días se conservó el color, prácticamente inalterable. pH≈7
1H	[6] Aplica observación [5], salvo que se percibió trazas de decoloración y la capa blanca sobrenadante similar a la señalada en [1].
2H	[7] Aplica observación [5], añadiendo la notoria banda rojiza similar a la de [4].
3H	[8] La solución inicial estaba coloreada de tono rojo-café intenso. Al cabo de 2 días, se apreció una pérdida del color inicial, tornándose el líquido amarillo pálido; en el fondo del tubo se observó un líquido o masa de color café muy oscuro, en tanto que una capa superior, como una fase ligera, presentó el color rojo de las soluciones iniciales.

CONCLUSION. La temperatura parece no ser un elemento determinante en la decoloración y descomposición del pigmento en solución acuosa. La presencia de la capa sobrenadante de color blanco y la de color rojo sugiere -probablemente- algún tipo de actividad enzimática, que aparentemente no degrada al pigmento rojo en su totalidad. El cambio de pH -más ácido en el caso de los extractos sometidos a

calentamiento- sugiere un proceso de fermentación, favorecido por el oxígeno disuelto en el agua y el ambiental.

El color amarillo y la masa de color café observado en [8] puede atribuirse a los taninos, los cuales -cualitativamente- también parecen estar en mayor proporción en las hojas que en los tallos de *Justicia spicigera*.

3.2.2. EFECTO DEL pH.

Se prepararon dos soluciones acuosas de hojas y tallos, por separado, de forma análoga a la señalada en la sección 3.2.1. En esta prueba, se diluyó con agua hasta que las soluciones se tomaran transparentes -sin que se perdiera el color- y se colocaron 10 ml en 12 tubos de ensayo, 6 de ellos para cada solución.

Para fines de comparación, se reservaron dos tubos con solución de hoja y tallo, designados con la letra T, respectivamente, empleando la nomenclatura propuesta en la sección anterior. Se procedió a acidular los tubos numerados como 1 y 2 con solución de hojas, a $\text{pH} \approx 2$ y $\text{pH} \approx 4$, respectivamente, añadiendo gotas de HCl al 10 %. Los tubos numerados como 3, 4 y 5 se alcalinizaron hasta un pH aproximado de 9, 11 y 13, para lo cual se empleó una solución de NaOH al 10 %. El mismo procedimiento se aplicó a los restantes tubos de ensayo con la solución de tallos.

Los tubos permanecieron 24 horas expuestos al medio ambiente, es decir, luz solar y aire.

Posteriormente, se repitió el mismo ensayo, pero reduciendo la cantidad de vegetal empleado para preparar las soluciones y se observó que no aparecía el precipitado en medio ácido ni en alcalino. La intensidad del color al cambio de pH

también pudo asociarse a la cantidad presente del vegetal en solución, apareciendo los colores más pálidos al disminuir aquella. Por comparación visual, se advirtió que a igual cantidad de tallos y hojas les correspondía una solución acuosa de color diferente -como en el caso del efecto de la temperatura- siendo más intenso el producido por hojas. También los precipitados fueron más abundantes en las soluciones de éstas.

Para concluir este ensayo, se observó que las soluciones a $\text{pH} \approx 2$, una vez filtrado el sólido contenido en ellas, podían regenerar el color rojo típico del pH neutro, por adición de NaOH al 10 %. En el caso de las soluciones alcalinas, a $\text{pH} \approx 9$, dicho fenómeno también pudo ser apreciado al acidular hasta pH neutro y también a pH ácido se percibió la coloración naranja ya señalada.

Véase la tabla 3.3. con la descripción de los fenómenos observados en esta prueba.

TABLA 3.3. EFECTO DEL pH.

TH	[1] Coloración roja, con ligeros tonos azules, brillante, transparente a simple vista. Después de 1 día hubo decoloración.
1H	[2] Al añadir el ácido la solución se tornó naranja brillante, transparente; después de 1 día se observó la aparición de un precipitado de color rojo, de partículas muy finas.
2H	[3] Aplica la observación anterior, excepto la aparición del precipitado.

3H	[4] El color de la solución se tomó más roja al contacto con la solución de NaOH. Al cabo de 1 día, se observó un precipitado verde pálido, de aspecto gelatinoso, y la solución tenía un color verde amarillento.
4H	[5] Aplica observación [4].
5H	[6] Aplica observación [4], haciendo hincapie en el hecho de observarse la mayor cantidad de precipitado.
Tt	[7] Aplica observación [1].
1t	[8] Aplica observación [2].
2t	[9] Aplica observación [3].
3t	[10] Aplica observación [4].
4t	[11] Aplica observación [4].
5t	[12] Aplica observación [4].

CONCLUSION. El extracto acuoso de *Justicia spicigera* es sensible al cambio de pH. El color naranja observado a $\text{pH} \approx 2$ se puede atribuir a la presencia predominante del catión flavilio; en el caso del color de las soluciones cuyo pH fue alcalino es señal de que existen flavonoides hidrosolubles -cuyo color al pH señalado generalmente es amarillo- y, siendo azul el color de la especie antocianina en ese medio, se obtiene el matiz verde por combinación de los colores mencionados. También la presencia del catión Fe^{3+} genera la tonalidad amarilla y, no es descartable, esto puede explicar la presencia de dicho color en la solución acuosa.

El cambio de color es reversible, obedeciendo al pH del medio. Nótese que el $\text{pH} \approx 9$ es muy alto, tratándose de la estabilidad de las antocianinas y, no obstante, se pudo comprobar la reversibilidad del color. El pigmento se comporta como un indicador ácido-base.

Cualitativamente, se sugiere que existe una mayor cantidad de colorante en las hojas que en los tallos, por partir de soluciones hechas con iguales cantidades de uno y otro material, en iguales volúmenes.

Los precipitados obtenidos en esta prueba son de hierro, presumiblemente, debido a su color, apariencia y las condiciones de pH bajo las cuales se formaron (véase en el Apéndice II, gráfica de E° vs pH para el hierro y la sección correspondiente a la química analítica del hierro). Se sugiere que las soluciones acuosas de hojas aportan una cantidad superior de ambos tipos de precipitado a las generadas por las soluciones de tallos.

Quedará pendiente para un ensayo posterior la identificación de los precipitados presentes en esta prueba (sección 3.4.).

3.2.3. COMPORTAMIENTO DEL EXTRACTO ACUOSO CONCENTRADO.

La prueba consistió sencillamente en obtener varios extractos -en frío- de tallos y hojas, disponiéndolos en vasijas o recipientes abiertos, completamente expuestos a luz solar y aire, permitiendo que el agua se evaporara. Se dejaron en estas condiciones por un período de 6 meses. Las observaciones correspondientes se ilustran en la tabla

3.4.

Cabe señalar que los extractos presentaban la formación de corpúsculos de color blanco o una capa de color blanco, tenue, y un olor muy similar al de los frutos fermentados cuando el líquido no lograba evaporarse antes de la degradación. También en este caso se realizaron soluciones para probar el efecto del pH, siendo los resultados similares a los señalados en la sección 3.2.3., esto es, reversibilidad del color y formación de precipitados -a $\text{pH} \approx 2$ y 9 -, salvo que en la solución alcalina el precipitado fue un polvo fino y de color pardo.

TABLA 3.4. EXTRACTOS ACUOSOS CONCENTRADOS.

TALLO	[1] El extracto acuoso concentrado tiene un color café con ligero tono rojizo. Su consistencia es semejante a la miel, pero menos fluida, con una notable adherencia a las superficies en contacto (plástico y vidrio), lo que hace difícil su manipulación, incluso empleando una espátula. El olor del extracto es herbal. Al cabo del tiempo estipulado, estas características permanecieron inmutables. Cuando se añadió agua fría a los extractos, se presentó la coloración roja típica de la solución acuosa normal, pero con cierta formación de espuma en el líquido, generada en mayor grado al agitar.
-------	---

HOJA	[2] El extracto concentrado presenta un aspecto de lámina o capa de color púrpura intenso, fácilmente desprendible de las superficies en contacto, obteniéndose pequeñas partículas sólidas o polvo fino. El olor del extracto es herbal. Una vez transcurrido el tiempo, las características de éste no se alteraron. Con la adición de agua fría se generaba el color rojo de la solución inicial, con el mismo efecto espumante descrito anteriormente.
------	--

CONCLUSION. El extracto acuoso concentrado es sumamente estable en el medio ambiente. No parece afectarlo la luz solar y el aire, en tanto se realice la evaporación rápidamente antes de que inicie el fenómeno de fermentación, es decir, la estabilidad del pigmento concentrado es enteramente superior a la estabilidad observada en solución acuosa.

El precipitado pardo que se menciona anteriormente es de suponer que se trata de hierro, por sus características físicas y por el pH bajo el cual se generó (véase el Apéndice II, figura 1.).

3.3. CARACTERIZACION DEL PIGMENTO HIDROSOLUBLE.

3.3.1. CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA Y ESPECTROS UV-VIS E INFRARROJO.

Se procedió a realizar pruebas de cromatografía de capa fina con el extracto acuoso de hojas -previamente secado hasta total evaporación del agua a temperatura

ambiente-, empleando gel de sílice (Silicagel 60 GF₂₅₄) y acetato de etilo para preparar la fase estacionaria y se usó etanol absoluto como eluyente. Se diluyó con una gota de agua una porción del pigmento para ser aplicado con el capilar sobre la cromatoplaca (placa de vidrio).

Un segundo ensayo fue realizado utilizando como eluyente metanol ligeramente acidulado (MeOH-HCl, 99.5:0.5). Se aclara que no se reportarán valores de R_f , ya que las cromatoplas no son constantes y uniformes en cuanto a la fase estacionaria y la literatura registra valores para ese parámetro sólo en cromatografía sobre papel. Véase la tabla 3.5.

Se pesaron 10 mg del pigmento proveniente de hojas y se obtuvieron sus espectros UV-visible, cuyos máximos de absorción se registraron en $\lambda=197$ y $\lambda=585.1$ nm, respectivamente (figuras 3.1 y 3.2). Se usó agua como disolvente.

Todos los espectros que se mencionarán se presentan al final de este capítulo.

Un rápido ensayo condujo a la observación de un fenómeno inédito: una muestra de 4 g del pigmento fue mezclada en tubo de ensayo con 5 ml de sulfoxido de dimetilo normal -en baño María-, obteniéndose, luego de 24 horas en reposo y expuesto al medio, un extracto de color rojo brillante, con tonos azules hacia la superficie líquida. Una vez filtrado el extracto se envió a espectroscopía, obteniéndose una señal intensa en el visible: $\lambda_{\text{máx}}=617.4$ nm (figura 3.3.).

Para obtener los espectros UV-VIS se empleó un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2. En el caso del espectro IR se registraron los siguientes datos:

IR ν máx. cm^{-1} (KBr): 3418, 2935.8, 1636, 1551.6, 1404, 1210.4, 1096, 668, 615.7.

Los espectros IR se obtuvieron en un espectrofotómetro Transformada de Fourier 1600 Perkin-Elmer.

TABLA 3.5. CROMATOPLACAS DEL EXTRACTO ACUOSO.

HOJA	<p>[1] La muestra eluida con etanol se separa, avanzando una mancha roja pálida hasta 3/4 de la longitud de la placa, dejando un rastro de color violeta muy pálido. En el punto de aplicación queda una mancha violeta parda.</p> <p>[2] Revelando con yodo se observan las manchas descritas en [1], sin otro hallazgo.</p> <p>[3] La muestra eluida con MeOH-HCl se separa dejando una mancha o estela de color café rojizo pálido, en seguida una mancha naranja y, hasta la parte superior, una mancha rojiza pálida. En el punto de aplicación quedó una señal de color café rojizo pálido.</p> <p>[4] Revelando con yodo se detallan las manchas descritas en [3]. No hay indicio de otro tipo de señal que acuse la presencia de otros componentes.</p>
------	---

CONCLUSION. A través de la cromatografía se aprecian las trazas de compuestos coloridos, siendo éstos, aproximadamente, 3: antocianinas, flavonoides y

taninos. Los colores observados corresponderían a aquéllos y sus combinaciones (cromatoplaça eluida con MeOH-HCl); en el caso de la cromatoplaça eluida con etanol se advierte la presencia de un compuesto, como mínimo, que se equipara a las antocianinas.

Es factible suponer que la señal tan intensa en el visible -con agua como disolvente- sea causada por una antocianina, cuando menos y, por otra parte, la señal en el ultravioleta acusa posibles impurezas o estructuras químicas que abaten tal señal, pues se supondría una longitud de onda mayor.

El sulfoxido de dimetilo es una sustancia polar y se explica que tenga capacidad para extraer un compuesto como la antocianina, de hecho, se podría manejar como antecedente para obtener los espectros RMN de aquélla. Otra vez se advierte una longitud de máxima absorción en el visible muy pronunciada.

En el caso del espectro IR, cabría la siguiente interpretación:

TABLA 3.6. ESPECTRO IR DEL PIGMENTO EXTRAIDO CON AGUA.

ν (cm ⁻¹)	INTERPRETACION
3418	Banda ancha por -OH.
2935.8	Señal por C-H, con carbono sp ² .
1636	Alargamiento C-C por enlaces dobles.
1551.6	Alargamiento C-C por enlaces en sistema aromático.

1404	Banda de flexión O-H para grupo carboxilo.
1210,4	Señal por unión simple C-O para fenol.
1096	Señal por unión simple C-O para grupo éter.
668	Grupo -OH fuera del plano.
615.7	Grupo -OH fuera del plano.

La información que finalmente se desprende de este espectro -por la magnitud y forma de las bandas- es la que correspondería a una estructura con numerosos grupos -OH, uniones carbono-oxígeno y estructuras aromáticas, que son elementos comunes a las antocianinas, sin descartar la interferencia de estructuras propias de los otros compuestos hidrosolubles cuya presencia se advirtió en las pruebas de cromatografía.

Véase la figura 3.4. que esquematiza el espectro descrito.

3.3.2. FORMACION DE COMPLEJOS CON PLOMO.

Se describe la labor experimental, en pasos secuenciales, en la tabla 3.7.

Aquí se obtienen complejos de antocianina -como se supone- formados con plomo, mediante la adición de una sal de éste en medio acuoso, donde precipitan y se consigue la separación requerida al remover el plomo, finalmente, como sulfuro.

TABLA 3.7. FORMACION DE COMPLEJOS.

[1] Pesar 4.9667 g de hojas.

[2] Añadir las hojas a un vaso de precipitados de 250 ml con un volumen de 200 ml de agua.
[3] Calentar en parrilla hasta los primeros indicios de ebullición.
[4] Enfriar a temperatura ambiente.
[5] Filtrar el extracto y transvasar el líquido a un matraz Erlenmeyer de 250 ml, provisto de agitador magnético.
[6] Adicionar al extracto 5.1930 g de acetato de plomo, poco a poco, agitando continuamente durante 30 min.
[7] Dejar en reposo la mezcla anterior durante 24 horas, tapando el matraz y fuera de contacto con luz solar.
[8] Filtrar el precipitado.
[9] Suspender el precipitado en etanol (destilado a partir de etanol desnaturalizado).
[10] Adicionar Na_2S poco a poco, agitando la mezcla.
[11] Filtrar el precipitado de PbS .
[12] Permitir la evaporación del etanol que contiene al pigmento.

Al añadir el acetato de plomo se nota inmediatamente la formación de un precipitado de color pardo oscuro, de consistencia gelatinosa, fácilmente observable en el papel filtro una vez que se le separa de la solución acuosa, la cual conserva un color rojo intenso, de igual aspecto que la solución original.

Cuando se ha suspendido el precipitado en etanol, se obtiene una solución de color pardo; adicionando el sulfuro de sodio se aprecia rápidamente la aparición de un color rojo brillante. Al término de la filtración del sulfuro de plomo de la solución etanólica, ésta presenta una intensa coloración roja brillante, con tonos violeta o azules perceptibles hacia la superficie del líquido y cuando se observa en un vaso de vidrio a contraluz (muy silimilar al aspecto que se observó en el extracto con sulfóxido de dimetilo).

Una vez evaporado todo el etanol se obtuvo un sólido con aspecto de pequeñas placas de color violeta intenso. Añadiendo etanol absoluto a este producto y disolviendo, se recrystalizan agujas de color violeta intenso (producto A).

CONCLUSION. El producto A sugiere poderosamente la presencia de al menos una antocianina, debido al fenómeno de precipitación de complejos con plomo y la coloración obtenida en solución etanólica, así como el sólido cristalizado a partir de ésta, cuyo aspecto físico se asemeja al descrito por la literatura para las antocianinas (tabla C.2. del Apéndice I).

3.3.3. CROMATOGRAFIA, ESPECTROS UV-VIS E INFRARROJO Y PUNTO DE FUSION DEL PRODUCTO A.

Se obtuvieron dos cromatoplasmas con el producto A en solución etanólica (tabla 3.8). Procediendo en forma similar a la descrita en la sección 3.3.1, se empleó el extracto acuoso para fines de comparación.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

El espectro en el visible del producto A arrojó un máximo de absorción en $\lambda=491.6$ nm (figura 3.5.), en tanto que no se registró absorción en el ultravioleta. Para ambos espectros se empleó metanol con 0.5 % de HCl como disolvente.

TABLA 3.8. CROMATOPLACAS CON EL PRODUCTO A.

PRODUCTO A	<p>[1] La cromatoplaaca eluida con etanol permitió ver una mancha de color violeta pálido, en el punto de aplicación, y una mancha con ligero avance de color violeta pálido. Revelando con yodo se aprecian los mismos fenómenos.</p> <p>[2] La segunda cromatoplaaca presentó una mancha ovalada cuya parte inferior resultó de color rojizo pálido, y el resto era de color rosado violáceo muy tenue. No hubo rastro de alguna sustancia en el punto de aplicación. La mancha se desplazó hasta la mitad de la cromatoplaaca. El yodo no señala otros compuestos.</p>
-------------------	---

El espectro IR arrojó los siguientes datos:

IR v máx. cm^{-1} (KBr): 3430, 3285.4, 3176.7, 2246, 1702, 1640, 1568, 1414, 1342.3, 1020, 808, 642, 524.

El producto A tuvo un intervalo de fusión comprendido entre 308-320 °C. Se empleó un aparato Osyma para determinación de puntos de fusión y se reporta dicho intervalo sin corregir.

CONCLUSION. El producto A presenta las características de una antocianina, por el color observado en las cromatoplacas y su punto de fusión, éste último sugiere poderosamente que se trata de una sal de flavilio.

La señal en el visible indica que, a diferencia del extracto acuoso, se removieron sustancias o entes cuyo efecto es de tipo batocrómico. En el ultravioleta, no obstante, sin absorción, supone nuevamente la presencia de algún compuesto o impureza que abate la señal.

En el espectro IR del producto A -véase la figura 3.6.- se aprecian bandas más finas que en su antecesor, debido, probablemente, a una menor asociación molecular, generada por el propio tratamiento químico que dio origen al producto A. Nuevamente, se hacen presentes elementos estructurales típicos para las antocianinas.

Se propone en la siguiente tabla la interpretación para el espectro IR :

TABLA 3.9. ESPECTRO IR DEL PRODUCTO A.

ν (cm ⁻¹)	INTERPRETACION
3430	Banda ancha por grupo -OH.
3285.4	Señal por -OH.
3176.7	Señal por -OH.
2246	Sistema aromático (conjunto de señales enmascaradas en una sola).
1702	Señal por unión C=O en grupo carbonilo.
1640	Carbono tipo sp ² (doble unión C=C).

1568	Alargamiento C-C en sistema aromático.
1414	Grupo metilo ó metileno
1342.3	Unión simple C-O.
1020	Señal para alcohol primario.
808	Estructura cíclica con enlaces dobles; grupo alqueno.
642	Grupo -OH fuera del plano.
524	Grupo -OH fuera del plano.

3.3.4. FORMACION DE COMPLEJOS CON ALUMINIO: UN ENSAYO

BREVE.

Se procedió a cubrir el fondo de un recipiente de aluminio con una capa fina del extracto acuoso mezclado con unas gotas de HCl al 10 %. Se dejó nuevamente evaporar el líquido remanente y se observó una capa de un sólido fuertemente adherido a las paredes del recipiente de color rojo-café (producto B).

Con 10 mg del producto B se obtuvieron los espectros UV y visible -empleando agua como disolvente- registrando las siguientes señales de máxima absorción, para dos muestras, respectivamente:

(1) $\lambda=329$ nm, 584.3 nm (figuras 3.7 y 3.8)

(2) $\lambda=330.2$ nm, 583.9 nm (figuras 3.9 y 3.10)

CONCLUSION. En este punto se aprecia, cualitativamente, un desplazamiento batocrómico en el ultravioleta, originado por un metal. Las condiciones de acidez - probablemente- contribuyeron a desplazar los equilibrios existentes para favorecer la manifestación de algún compuesto colorido en dicha señal; este indicio señala la probable presencia de una antocianina.

3.4. IDENTIFICACION DE LOS PRECIPITADOS FORMADOS EN SOLUCION ACUOSA; ENSAYOS A LA GOTA.

Los precipitados obtenidos a partir de las soluciones acuosas de hojas y tallos (sección 3.2.3) fueron sometidos a los ensayos a la gota convencionales para identificación de hierro (ver el Apéndice II). Se designará como precipitado A al obtenido a $\text{pH}\approx 2$, en tanto que el generado a $\text{pH}\approx 9$ se identificará con la letra B.

Se separaron los sólidos de sus aguas madres, filtrando con papel y dejando secar el material. Una vez secos, los precipitados se ensayaron para identificarlos.

TABLA 3.10. ENSAYOS A LA GOTA PARA IDENTIFICACIÓN DE HIERRO.

<p>PRECIPITADO A.</p> <p>[1] El sólido seco conserva el color rojizo observado en solución. Se cortó un trozo del papel filtro con el sólido adherido, colocándolo en una celda de ensayo a la gota y se adicionó HCl concentrado, gota a gota hasta la dilución completa del precipitado, es decir, cuando el papel filtro se tornó blanco y el líquido en la celda fue incoloro y transparente.. Después, se añadieron unas gotas de solución concentrada de KSCN, y se observó la aparición de un color rojo pálido en el líquido de la celda.</p>
--

PRECIPITADO B.

[2] El sólido seco conserva el color verde observado en solución. Se procedió de manera análoga a la señalada en [1], salvo el uso de o-fenantrolina, empleada como sólido, añadida al líquido de la celda hasta que fue claramente perceptible una coloración rosa pálido.

CONCLUSION. El precipitado A es óxido de hierro III (Fe_2O_3) hidratado, porque dió positiva la prueba del sulfocianuro (SCN^-), por formación de complejos con el Fe^{3+} . El precipitado B es hidróxido de hierro II ($\text{Fe}(\text{OH})_2$), debido a que dió positiva la prueba de o-fenantrolina, al aparecer el color típico de los complejos formados con el Fe^{2+} . Las especies químicas descritas son productos cuya formación obedeció al pH del medio en que se formaron.

Por último, se reporta la presencia de precipitados inorgánicos en las soluciones de extracto acuoso del pigmento de hojas, nuevamente aciduladas a pH aproximado a 2 y 9, en éste último caso, el precipitado fue de color pardo, a diferencia del color verde antes mencionado. Se sometieron a ensayo a la gota con KSCN siendo positivo en ambos casos.

3.5. CUANTIFICACION DE HIERRO EN HOJAS DE *JUSTICIA SPICIGERA*.

3.5.1. PARTE EXPERIMENTAL.

Se empleó el método de determinación espectrofotométrica de hierro vía curva de calibración.

En el apartado B del Apéndice II se describe un protocolo aplicado en especial para alimentos donde se cuantifica el Fe^{2+} . Para el caso presente, la determinación correspondió a Fe^{3+} -total-, y la técnica empleada es esencialmente la misma.

La cuantificación se hizo con cuatro muestras de hoja provenientes del mismo lote y se utilizaron cuatro soluciones estándar para construir la curva de calibración.

En la tabla adjunta se describe la primera fase de trabajo.

TABLA 3.11. CALCINACION DE LA MUESTRA.

[1] 1 g de hojas trituradas en mortero.
[2] Calcinación preliminar de la muestra en crisol a fuego directo (mechero) hasta cenizas.
[3] Adición de HNO_3 concentrado, poco a poco, y continuar con el calentamiento hasta que no haya emisión de humos de color amarillo.
[4] Evaporación de todo el HNO_3 remanente.
[5] Calcinación de la muestra en mufla a $700\text{ }^\circ\text{C}$ durante una hora.
[6] Adición de HNO_3 a la muestra -en frío- y llevar a ebullición, sin que se consuma el ácido.
[7] Preparación de la solución problema.

Con el tratamiento descrito se asegura que todo el hierro presente en la muestra sea oxidado a Fe^{3+} . La señal de que esto ha sucedido y además se ha ejecutado una calcinación conveniente es que al cabo de la calcinación en la mufla el fondo de los

crisoles sea de color blanco o bien ligeramente pardo y que al añadir el ácido en la última parte del tratamiento se forme una solución incolora, transparente, la cual no deberá ser filtrada.

La cantidad de ácido adicionado -de acuerdo al paso [3]- osciló entre 20 y 25 ml por muestra y en el paso [6] se agregaron 2 ml, teniendo en cuenta que se aforaría a 10 ml. Se transvasó cuantitativamente el líquido del crisol a un vaso de precipitados, adicionando agua destilada al crisol y agitando para arrastrar todo el contenido de éste; una vez transvasado el líquido del vaso a un matraz volumétrico de 10 ml, se procedió a aforar con agua destilada y se homogeneizó.

En la tabla 3.12. se describe el procedimiento para preparar las soluciones estándar y problema.

Por último, se presentarán los resultados obtenidos a partir de las mediciones hechas en un espectrofotómetro convencional Perkin-Elmer, correspondientes a una longitud de onda igual a 480 nm y utilizando celdas de 1 cm de diámetro (tabla 3.13.).

TABLA 3.12. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES ESTANDAR Y PROBLEMA.

[1] Solución patrón de Fe^{3+} (hierro 90 % puro diluido con HCl) 3.3×10^{-3} M.
[2] Solución de NaSCN al 15%.
[3] Solución de H_2SO_4 al 15 %.
[4] Solución de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (persulfato de amonio) al 1 %.

[5] Adición de 1 ml de la solución [3] + 1 ml de la solución problema (ó 0.1 a 0.4 ml de la solución patrón) + 1.5 ml de [4] + 5 ml de [2] a un matraz volumétrico de 25 ml, siguiendo el orden descrito.
[6] Aferrar a 25 ml con agua destilada y homogeneizar.
[7] El blanco será preparado de forma similar, excepto la adición de Fe^{3+}
[8] Iniciar las mediciones espectrofotométricas.

3.5.2. RESULTADOS EXPERIMENTALES Y CALCULOS.

Se designan con las etiquetas E1, E2, E3 y E4 a las soluciones estándar, respectivamente, según contengan 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 ml de la solución patrón. Las soluciones problema tendrán las etiquetas M1, M2, M3 y M4. El contenido de hierro será reportado en partes por millón. Se presentan también las memorias de cálculo, la regresión lineal y desviación estándar correspondientes.

TABLA 3.13. ABSORBANCIAS Y CONCENTRACIONES.

SOLUCION	ABSORBANCIA (A)	MOLARIDAD (M x 10 ⁵)	PPM
E1	0.295	1.32	
E2	0.445	2.64	
E3	0.61	3.96	
E4	0.72	5.28	

SOLUCION	ABSORBANCIA (A)	MOLARIDAD (M x 10 ⁵)	PPM
M1	0.49	3.047	425.54
M2	0.67	4.697	655.91
M3	0.435	2.543	355.15
M4	0.555	3.643	508.73

A. Cálculo de la concentración de los estándares. Para la solución E1 (0.1 ml de solución patrón, aforando a 25 ml):

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

donde V = volumen y C = concentración

$$C_2 (E1) = (0.1 \text{ ml} \times 3.3 \times 10^{-3} \text{ M}) / 25 \text{ ml} = 1.32 \times 10^{-5} \text{ M}$$

B. Regresión lineal y cálculo de las concentraciones de las soluciones

problema. Sea la ecuación de una línea recta $y = a + bx$ (recuérdese la Ley de Beer:

$A = \epsilon bc$, donde ϵ es la absorbanza molar, B la longitud de celda y c la concentración),

se calcula la regresión (absorbancia vs concentración) con los estándares:

$$a = 0.1575$$

$$b = 10909.09091$$

$$r = 0.9969039059$$

la concentración de la solución M1 será:

$$[M1] = (y - a) / b = (0.49 - 0.1575) / 10909.09091 = 3.047 \times 10^{-5} \text{ M}$$

C. Cálculo de las partes por millón. Siendo el peso de una mol de hierro igual a 55.847 g y teniendo como referencia 1 g de hojas secas de *Justicia spicigera*, se calcula los siguiente:

$$3.047 \times 10^{-5} \text{ mol Fe} \times 25 \text{ ml} \times (1 / 1000 \text{ ml}) = 7.619 \times 10^{-7} \text{ mol Fe}$$

$$7.617 \times 10^{-7} \text{ mol Fe} \times 10 \text{ ml} \times (1 / 1 \text{ ml}) = 7.619 \times 10^{-6} \text{ mol Fe}$$

$$7.617 \times 10^{-6} \text{ mol Fe} \times 55.847 \text{ g/mol Fe} = 4.255 \times 10^{-4} \text{ g Fe por 1 g de hoja}$$

$$4.254 \times 10^{-4} \text{ g Fe} \times 1000 = 0.4255 \text{ g Fe por 1 Kg de hoja}$$

$$0.4225 \text{ g} \times (1 / 1 \text{ g}) \times 1000 \text{ mg} = \underline{425.54 \text{ ppm}}$$

D. Desviación estándar y ppm promedio. La desviación estándar fue $\sigma = 129.3093872$ y las ppm promedio 486.33. Para fines de comparación, finalmente, se dirá que el contenido de hierro en 100 g de hojas secas es igual a 48.63 mg. Posteriormente este número será confrontado con otras fuentes de hierro vegetales.

CONCLUSION. De acuerdo al resultado anterior, se puede afirmar que el vegetal es rico en hierro, y, por tanto, tiene compuestos capaces de captarlo del suelo. El hierro presente en las hojas de *Justicia spicigera* puede contribuir a la intensificación de color del pigmento hidrosoluble, probablemente por la formación de un complejo con la antocianina de aquél.

Por último, cabe señalar que todo el trabajo experimental planteado en esta sección fue sugerido por la Q. Graciela Fernández, por comunicación personal y fue seleccionado para participar en el XXVIII Congreso Nacional de Ciencias

Farmacéuticas, en la categoría de Productos Naturales (7), bajo los auspicios de la Asociación Farmacéutica Mexicana A. C.

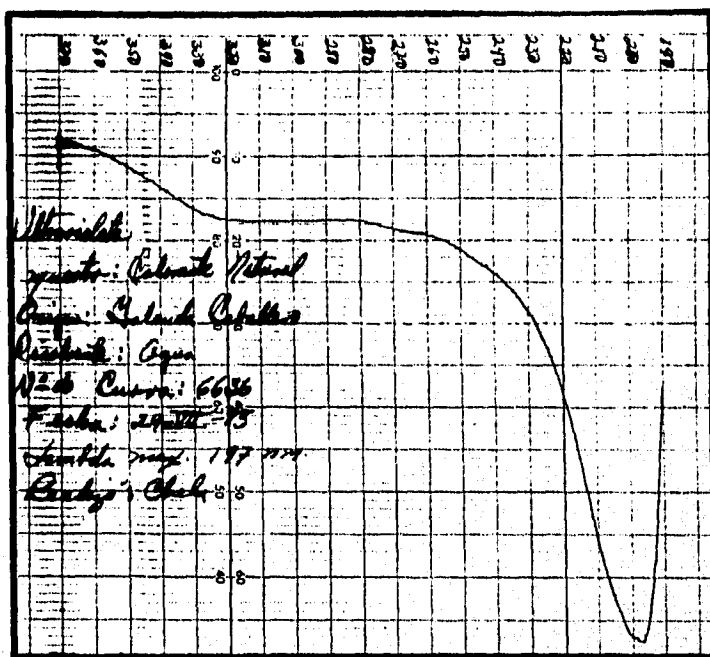


FIGURA 3.1. Espectro UV del pigmento hidrosoluble (disolvente: agua).

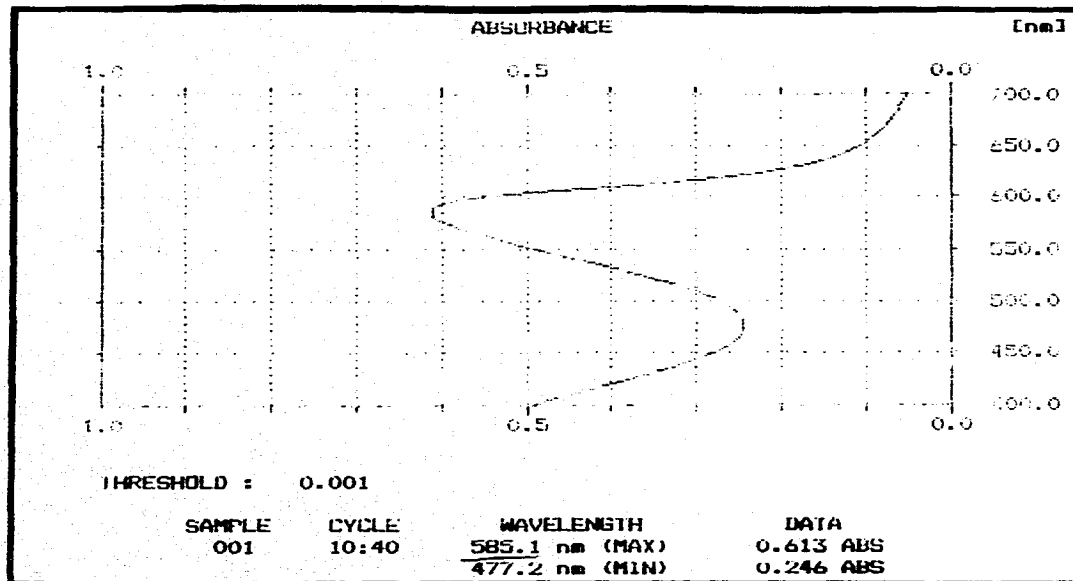


FIGURA 3.2. Espectro en el visible del extracto acuoso concentrado (disolvente:agua).

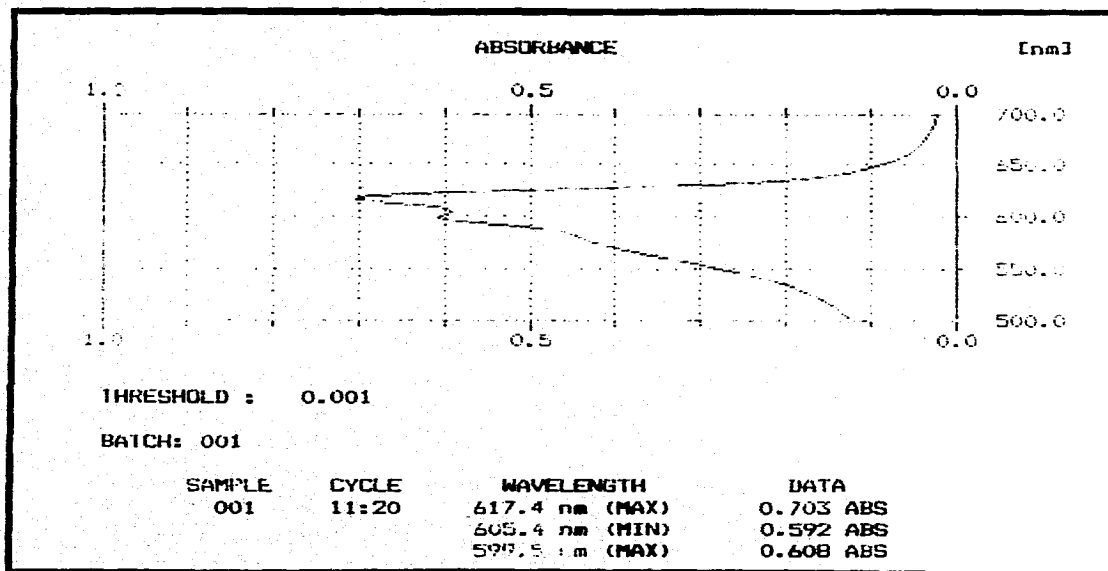


FIGURA 3.3. Espectro en el visible del pigmento hidrosoluble (disolvente:sulfóxido de dimetilo).

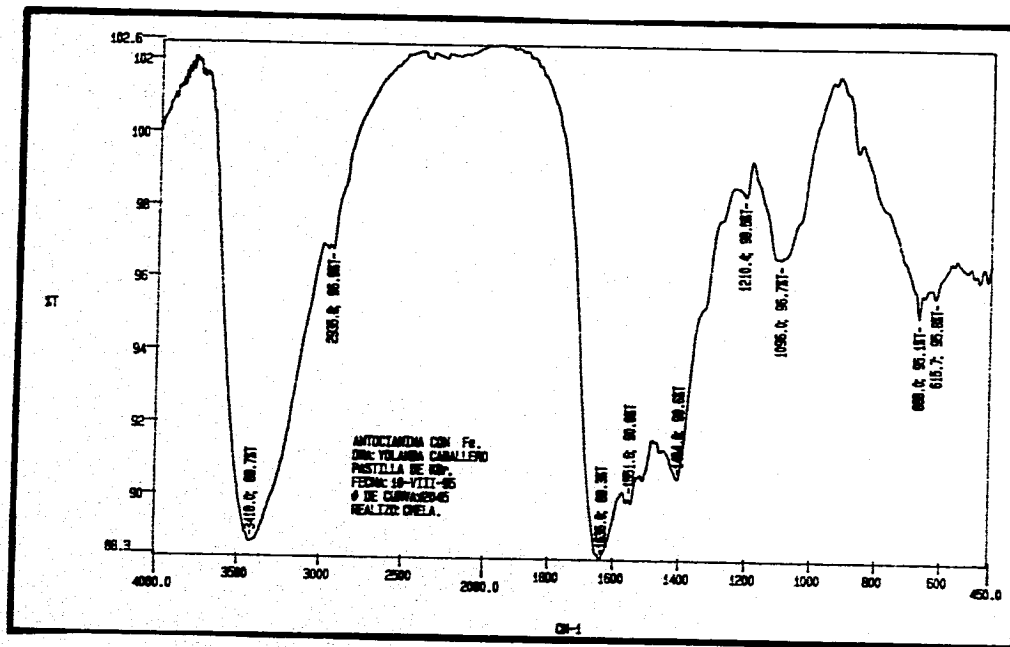


FIGURA 3.4. Espectro IR del pigmento hidrosoluble.

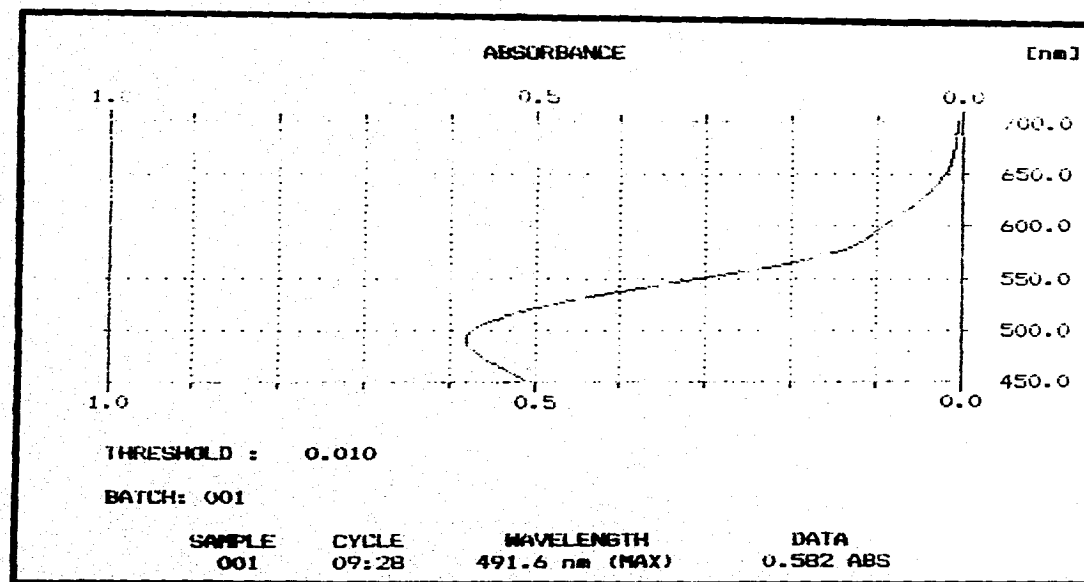


FIGURA 3.5. Espectro en el visible del producto A (disolvente: MeOH-HCl).

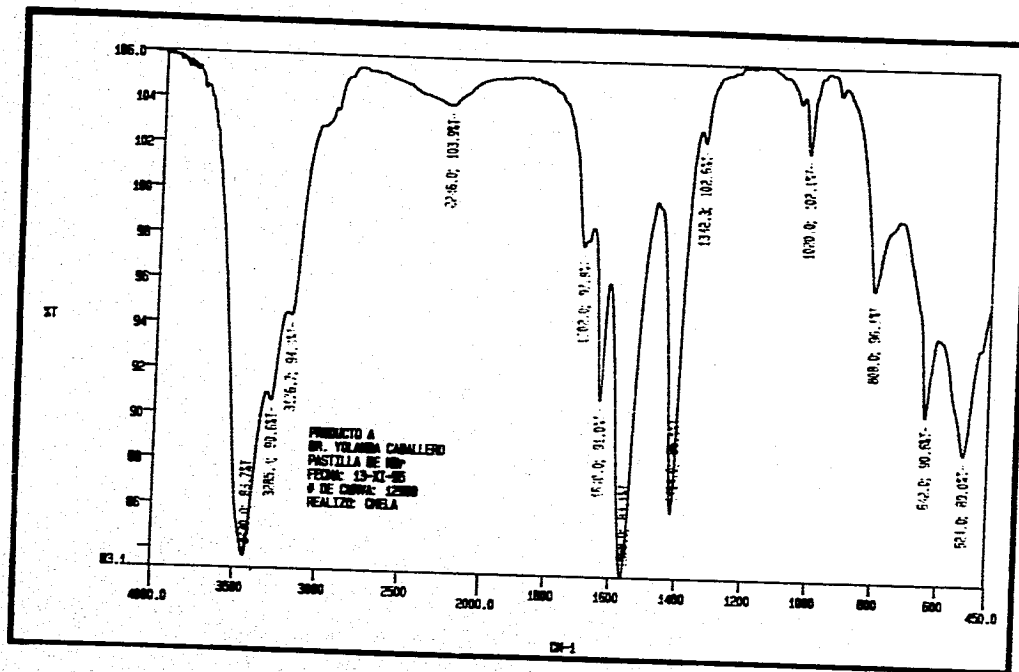


FIGURA 3.6. Espectro IR del producto A.

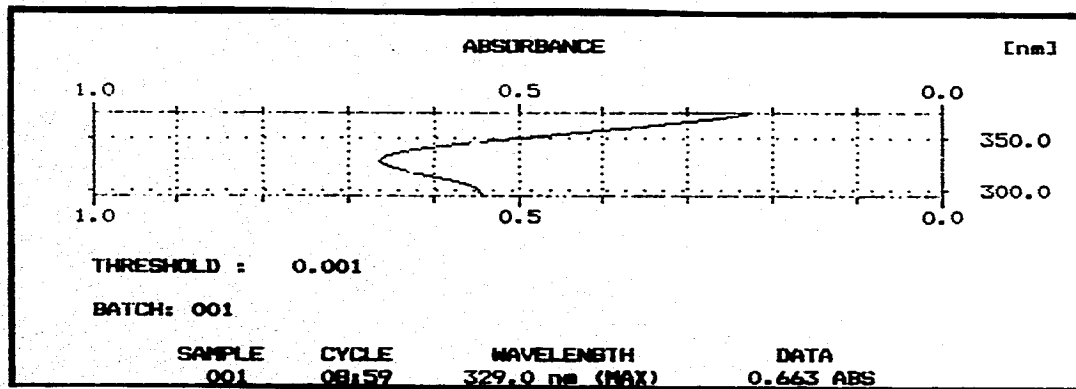


FIGURA 3.7. Espectro UV (1) del producto B (disolvente:agua).

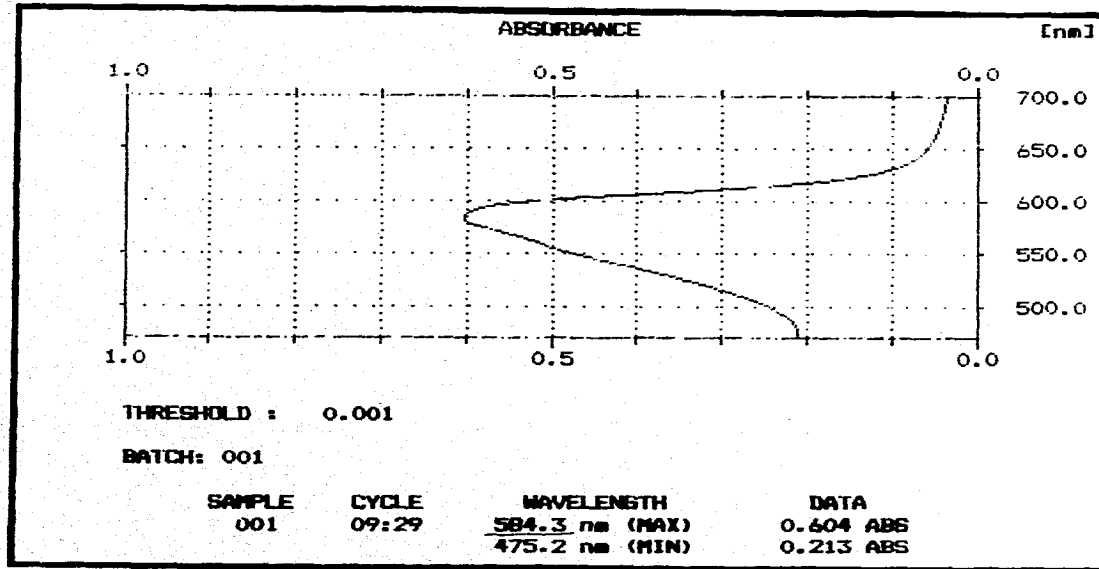


FIGURA 3.8. Espectro en el visible (1) del producto B (disolvente:agua).

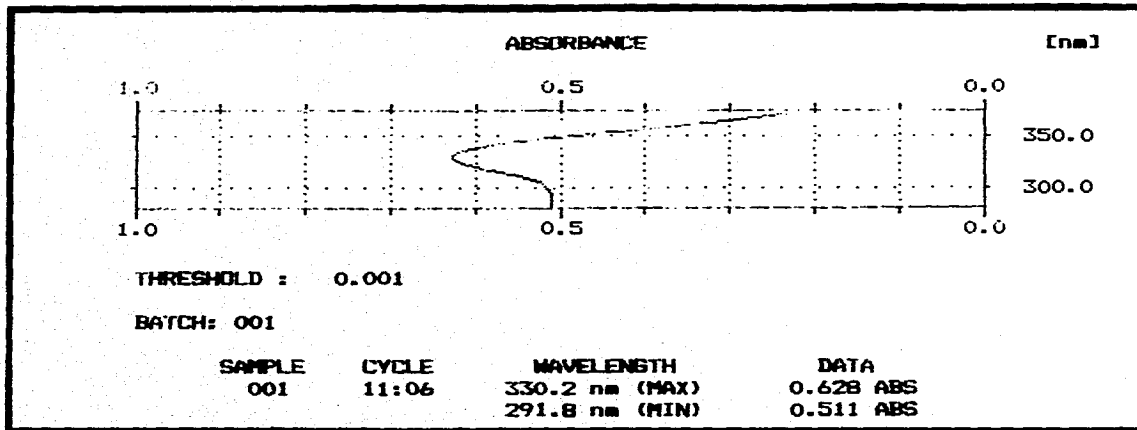


FIGURA 3.9. Espectro UV (2) del producto B (disolvente:agua).

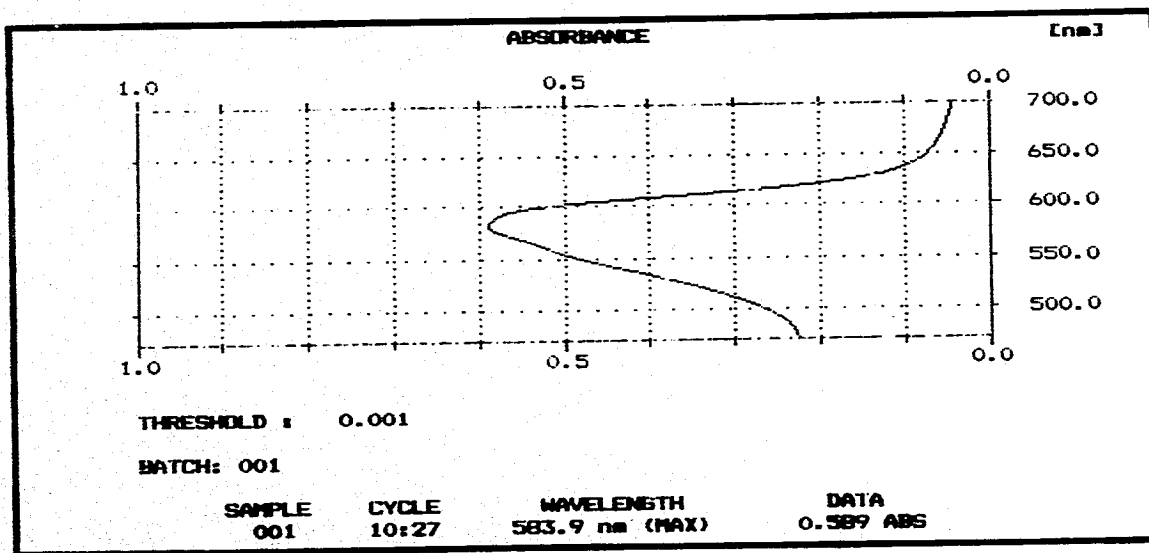


FIGURA 3.10. Espectro en el visible (2) del producto B.

C A P I T U L O 4

CONCLUSIONES

Y

RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES.

1. Se concluye que las hojas de *Justicia spicigera Schl.* tienen, al menos, un compuesto colorido perteneciente a la familia de las antocianinas.

2. El pigmento es hidrosoluble, el color en solución acuosa es rojo intenso; también se disuelve en etanol y metanol ligeramente acidulado, originando soluciones rojas con tintes violeta o azules.. La estructura química posee cromóforos (dobles enlaces conjugados, estructuras aromáticas) y auxocromos (-OH), los que intensifican el efecto colorido de la estructura molecular en conjunto. La presencia de dichos grupos se aprecia en los espectros IR obtenidos en el proceso experimental.

3. Los cambios del pH alteran el color de la solución acuosa del pigmento, comportándose como un indicador ácido-base típico.

4. La temperatura y la luz solar no parecen afectar seriamente la estabilidad del pigmento extraído en solución acuosa. Esto es relevante si se piensa en aplicaciones prácticas.

5. La cromatografía de capa fina para el extracto acuoso señala la presencia de un par de sustancias, como mínimo, semejantes a las antocianinas, por sus colores: rojo y violeta.

6. La señal espectroscópica en la región del visible del extracto acuoso obtenido a partir de las hojas de *Justicia spicigera Schl.* se asemeja con las correspondientes a las antocianinas: $\lambda_{\text{máx}}=585.1 \text{ nm}$.

7. El pigmento en cuestión puede ser separado con plomo, por la formación de complejos con éste. Se propone que otros metales son capaces de formar dichos

compuestos, tal es el caso del aluminio. Con este último se observaron dos señales espectroscópicas en ultravioleta y visible, para un par de muestras, respectivamente:

λ máx=329, 584.3 nm y λ máx= 330.2, 583.9 nm (producto B)

De acuerdo con los datos reportados en la literatura, estas señales sugieren un efecto batocrómico, originado por un catión metálico.

8. Se obtuvo un sólido cristalino (producto A), a partir de los complejos con plomo y la remoción de éste: agujas color violeta intenso, de lustre metálico, con un intervalo de fusión total comprendido entre 308-320 °C, característico de un cloruro de flavilio, otra forma de las antocianinas ampliamente difundida en la naturaleza.

9. *Justicia Spicigera Schl.* es rica en hierro: 48.63 mg de Fe/100 g de hojas secas. Este número adquiere significado al confrontarlo con los siguientes vegetales (33):

Espinaca cruda	2.1 mg de Fe/100 g
Tomillo seco	123.6 mg de Fe/100 g

Las espinacas son muy comunes para todos, en tanto que el tomillo es una especia y también planta medicinal, siendo éste el que registró el mayor contenido de hierro entre los vegetales de consumo humano. De ahí la relevancia que motivó la comparación.

10. Teniendo los precedentes antes señalados, se concluye que *Justicia spicigera Schl.* posee antocianinas que forman complejos con el hierro, debido principalmente al hallazgo de la concentración del metal y a la longitud de onda de máxima absorción en el visible, la cual está desplazada. Este fenómeno podría explicar

la estabilidad observada para el pigmento extraído en solución acuosa. El catión Fe^{3+} es la forma en que estaría presente el hierro en complejos antociánicos, porque el Fe^{3+} tiende a formar complejos orgánicos a través de los grupos oxhidrilo vecinales, éstos últimos característicos de ciertas antocianidinas, a saber: cianidina, con un par de -OH vecinales en el anillo B; delphinidina, con tres -OH en el anillo B y petunidina, con dos -OH en posición orto y un grupo metoxilo en posición 3' del anillo B. Estas antocianidinas, por tanto, cumplen con los requisitos necesarios para la formación de complejos y una de ellas constituyó el producto A.

11. Se concluye que aquéllos individuos cuyo empirismo sugirió la utilidad médica de *Justicia spicigera Schl.* en enfermedades o malestares asociados con la sangre, no estaban del todo equivocados, cuando menos en el caso de la anemia.

12. Finalmente, cabe mencionar que durante el trabajo de investigación bibliográfica no se encontró trabajo alguno que registrara antocianinas aisladas -o traza de ellas- en plantas de la familia *Acanthaceae*, a la cual pertenece *Justicia spicigera Schl.*, y tampoco se hallaron datos de antocianinas cuyo origen fueran las hojas verdes de alguna planta.

4.2. RECOMENDACIONES.

1. Determinese la existencia del complejo metálico formado entre el hierro y la(s) antocianina(s) vía química analítica y la organometálica del hierro.

2. A partir de la determinación anterior se puede deducir un proceso metabólico de dicho complejo una vez que ingresa al organismo humano a través de *Justicia spicigera Schl.* y poder esclarecer si es suficientemente aprovechable el hierro.

3. Continuar con la investigación que permita caracterizar otros componentes químicos.

4. Realizar ensayos con los compuestos que puedan tener propiedades farmacológicas.

5. Con base en los puntos señalados, no sería descartable incorporar a *Justicia spicigera Schl.* en la dieta normal del individuo, para aprovechar el hierro. La mejor forma de conseguir tal propósito sería ingerir las hojas, principalmente, y tallos jóvenes o retoños en ensaladas crudas, de vegetales verdes, hortalizas, etc. Otra opción sería consumir las hojas cuando ya están secas, trituradas, espolvoreándolas sobre ensaladas de vegetales o de frutas. El sabor de las hojas y tallos jóvenes no es amargo, por lo que el vegetal se puede consumir como otro de los ordinarios. Para concluir, una última forma de aprovechar el hierro es preparar lo que se conoce como infusión, es decir, añadir el vegetal a un volumen de agua caliente -por debajo de su punto de ebullición- e ingerir la bebida así preparada, después de dejar la mezcla en reposo durante 10 minutos aproximadamente.

A P E N D I C E I

A. ANTOCIANINAS Y SUS FUENTES NATURALES.

FUENTE	ANTOCIANINA
Manzana	Cia-3-gal, cia-3-ara, cia-7-ara
Ciruela	Cia-3-glc, cia-3-rut, peo-3-glc, peo-3-rut
Uva (<i>Vitis vinifera</i>)	Cia-, del-, peo-, pet-, mal-3-glc, mal-3,5-diglc, mal-p-cumaroilglc-5-glc
Plátano	Pet-3-gli
Higo	Cia-3-gli
Fresa	Pel-3-glc, pel-3-gal, cia-3-glc

Cia: cianidina. Del: delphinidina. Mal: malvidina. Pel: pelargonidina. Peo: peonidina. Pet: petunidina.

Ara: arabinósido. Gal: galactósido. Glc: glucósido. Gli: glicósido. Rut: rutinósido.

H.D. Belitz & W. Grosch (3).

B. PROPIEDADES DE LAS ANTOCIANIDINAS COMUNES.

COMPUESTO	COLOR	λ MAX.	CAMBIO	P.M. ¹	P.F. ² (°C)
	VISIBLE	(nm) EN MeOH- HCl	DE COLOR CON AlCl ₃		
Pelargonidina ^a	Rojo	520	--	306.5	180 D
Cianidina ^b	Magenta	535	+	322.5	205 D
Peonidina ^c	Magenta	532	--	336.5	165 D
Delfinidina ^d	Púrpura	546	+	338.5	202 D
Petunidina ^e	Púrpura	543	+	352.5	≈ 179
Malvidina ^f	Púrpura	542	--	366.5	202 D

P.M: peso molecular. P. F: punto de fusión.

D: descomposición

1: peso correspondiente a la antocianidina en forma de cloruro de flavilio.

2: punto de fusión correspondiente al glicósido en forma de cloruro de flavilio [a: 7- β -glucósido, b y d: 3,5-diglucósido, c: 3,5-di- β -glucósido, e: 3,5-di- β -glucosil, f: 3- β -glucósido]

J. B. Harborne (22).

1,2: Dictionary of Organic Compounds (14).

C. PUNTOS DE FUSION.

TABLA C.1.

ANTOCIANIDINA (COMO CLORURO)	P. F. (°C)
Cianidina	300
Delfinidina	350
Pelargonidina	350

X. A. Domínguez (15).

TABLA C.2.

ANTOCIANIDINA (COMO CLORURO) Y GLICÓSIDOS SELECTOS	ASPECTO FISICO DEL SÓLIDO	P.F. (°C)
Cianidina (C ₁₅ H ₁₁ ClO ₆)	Agujas rojo-café, lustre metálico	> 300
3-glucósido (C ₂₁ H ₂₁ ClO ₁₁)	Placas o prismas café rojizo	205 D
3-galactósido (C ₂₁ H ₂₁ ClO ₁₁)	Agujas de color rojo, lustre bronceado	210-212 D
3,5-diglucósido (C ₂₇ H ₃₁ ClO ₁₆)	Placas de lustre metálico	203-204
Delphinidina (C ₁₅ H ₁₁ ClO ₇)	Prismas o agujas café o púrpura intenso, lustre metálico	> 350
Malvidina (C ₁₇ H ₁₅ ClO ₇)	Prismas o tabletas de color rojo, lustre metálico	> 300
3-5diglucósido (C ₂₉ H ₃₅ ClO ₁₇)	Agujas o prismas café rojizo	165 D
Pelargonidina (C ₁₅ H ₁₁ ClO ₅)	Prismas café rojizo	> 350

ANTOCIANIDINA (COMO CLORURO) Y GLICÓSIDOS SELECTOS	ASPECTO FISICO DEL SÓLIDO	P.F. (°C)
3,5-diglucósido (C ₂₇ H ₃₁ ClO ₁₅)	Agujas de color rojo	175-180 D
Peonidina (C ₁₆ H ₁₃ ClO ₆)	Agujas café rojizo	
3,5-diglucósido (C ₂₈ H ₃₃ ClO ₁₆)	Agujas púrpura intenso	165-167 D
Petunidina (C ₁₆ H ₁₃ ClO ₇)	Escamas o prismas café pardo	
3,5-diglucósido (C ₂₈ H ₃₃ ClO ₁₇)	Placas violeta	≈ 178

The Merck Index (34).

D. VALORES DE R_F (x 100, PULGADAS) PARA CROMATOGRAFIA SOBRE PAPEL.

COMPUESTO	FORESTAL ¹	FORMIC ²	BAW ³	BuHCl ⁴	1 % HCl ⁵
Pelargonidina	68	33	80		
Cianidina	49	22	68		
Peonidina	63	30	71		
Delfinidina	32	13	42		
Petunidina	46	20	52		
Malvidina	60	27	58		
Apigenidina ^a	75		74		
Luteolinidina ^b	61		56		
Pelargonidin 3- glucósido			44	38	14
Cianidin 3- glucósido			38	25	07
Malvidin 3- glucósido			38	15	06
Pelargonidin 3,5-diglucósido			31	14	23

COMPUESTO	FORESTAL ¹	FORMIC ²	BAW ³	BuHCl ⁴	1 % HCl ⁵
Cianidin 3- ramnosil glucósido			37	25	19
Peonidin 3,5- diglucósido			31	10	17
Delfinidin 3,5- diglucósido			15	03	08
Cianidin 3- ramnosil glucósido-5- glucósido			25	08	36
Pelargonidin 3- (p-cumaroil- glucósido)-5- glucósido			40	46	19

Nota: los datos se refieren a cromatogramas realizados sobre papel Whatman No. 3 o un equivalente.

1: HCl conc.-HOAc-H₂O (3:30:10).

2: HCl conc.-HCO₂H-H₂O (2:5:3).

3: n-BuOH-HOAc-H₂O (4:1:5).

E. DATOS ESPECTRALES UV (λ MAX., nm).

COMPUESTO	MeOH	HCl	AlCl₃	COLOR^I Y FLUORESCENCIA
Pelargonidina	270	506	506	O/OY
Cianidina	277	535	553	R/OR
Peonidina	277	532	532	dR/R
Delfinidina	277	546	569	B/R
Petunidina	276	543	557	B/R
Malvidina	275	542	542	B/R
Apigenidina	277	476	476	Y/Y
Luteolinidina	279	493	545	OY/OY

O: naranja. Y: amarillo. R: rojo. B: café. d: oscuro.

I: Color visible/fluorescencia UV.

T. W. Goodwin (20).

F. pH Y ABSORCIÓN EN EL VISIBLE PARA EL POLVO DE ANTOCIANINA E163.

pH	λ MAX. (nm)	COLOR
4	520	Rojo
4-6	525-550	Violeta-rojo, violeta-azul
6.5	570-575	Azul
9	590-600	Azul

J. N. Counsell (10).

G. DATOS ESPECTRALES DE RMN PARA ANTOCIANINAS SELECTAS.

G.1. ESTRUCTURA DE LA AWOBANINA.

Se ha sugerido que la awobanina -proveniente de *Commelina communis* L.- tiene como estructura química a delphinidin 3-(p-cumaroil-D-glucósido)-5-D-glucósido. Se procedió a tomar una muestra del cloruro de la awobanina disuelto en una mezcla de CD₃OD (metanol deuterado) y DCl en D₂O que dió como resultado el espectro de la figura 2, y el análisis del mismo es el siguiente:

1. No hay señal del grupo cis-p-cumaroilo.
2. El grupo p-cumaroilo está unido en la posición 6 de la glucosa, debido a un cambio a campo bajo aproximadamente en 1 ppm de las dos señales de protón en δ 4.44 correspondientes a 6 H de la glucosa.
3. Dos dobletes aparecen en δ 5.45 y 5.14, atribuidos a los protones anoméricos de dos moléculas de glucosa; las constantes de acoplamiento de ambas señales son iguales a 8 Hz, que indica claramente la configuración β de estas posiciones anoméricas.
4. Señales de protones aromáticos conducen a la estructura propia de la delfinidina.

La awobanina queda determinada, por lo tanto, como delfinidin 3-(6-o-trans-p-cumaroil- β -D-glucósido)-5-(β -D-glucósido).

G.2. ESTRUCTURA DE LA VIOLANINA.

El cloruro de violanina, obtenido de *Viola tricolor*, tiene asociada la estructura de delfinidin 3-[6-o- α -L-(p-cumaroil)ramnosil-D-glucósido]-5-D-glucósido. Se procedió de manera semejante que en el caso anterior para obtener el espectro RMN, cuyos datos son:

δ 8.86 (1H, s, H-4), 7.71 (2H, s, H-2' y 6'), 7.50 (1H, d, J=16 Hz, H_b), 7.34 (2H, $\Delta^1_2B^1_2$, J_{orto}=8 Hz, H-2'' y 6''), 6.98 (2H,s, H-6 y 8), 6.76 (2H, $\Delta^1_2B^1_2$, J_{orto}=8 Hz, H-3'' y 5''), 6.17 (1H, d, J=16 Hz, H_a), 5.48 y 5.17 (cada 1H, d, J=7 Hz, Glc H anomérico), 4.86 (1H, t, J=9.5 Hz, Rha H-4), 4.68 (1H, br.s, Rha H anomérico), 1.00 (3H ,d, J=6Hz Rha CH₃).

El análisis del espectro anterior es semejante al expuesto anteriormente, salvo en el punto 2, donde se distingue un triplete a δ 4.86, que indica la posición de unión del grupo p-cumaroilo a la ramnosa. Véanse los espectros adjuntos (figuras 2 y 3).

T. Goto et al (21).

Nota. Este análisis sirvió como precedente para el trabajo de Kondo y colaboradores (27), donde encontraron que la awobanina es, realmente, una malonildelfinidina.

II. APLICACION DE ANTOCIANINAS COMO COLORANTES DE ALIMENTOS.

ALIMENTO COLOREADO	ANTOCIANINA
Mazapán (todo el producto)	-
Goma de mascar	+
Dulce sólido (pieza compacta)	+
Dulce sólido (laminado)	+
Dulce frutal suave	+
Jalea de pectina	+
Goma (hecha con gelatina)	*
Jalea (con fécula)	+
Fondant	+
Golosinas (sometidas a cocción)	*
Helado (de crema)	*
Pastel	-
Cobertura de galletas	-
Pan	-
Bizcocho	-
Crema pastelera	+

ALIMENTO COLOREADO	ANTOCIANINA
Confitura	+
Bebidas	+
Mermelada	+
Jalea frutal	+
Helado (de agua)	+
Mazapán (cobertura)	+
Polvo para preparar refresco	+

+ Satisfactoria.

- No recomendable.

* Factible bajo modificación.

J. N. Counsell (10).

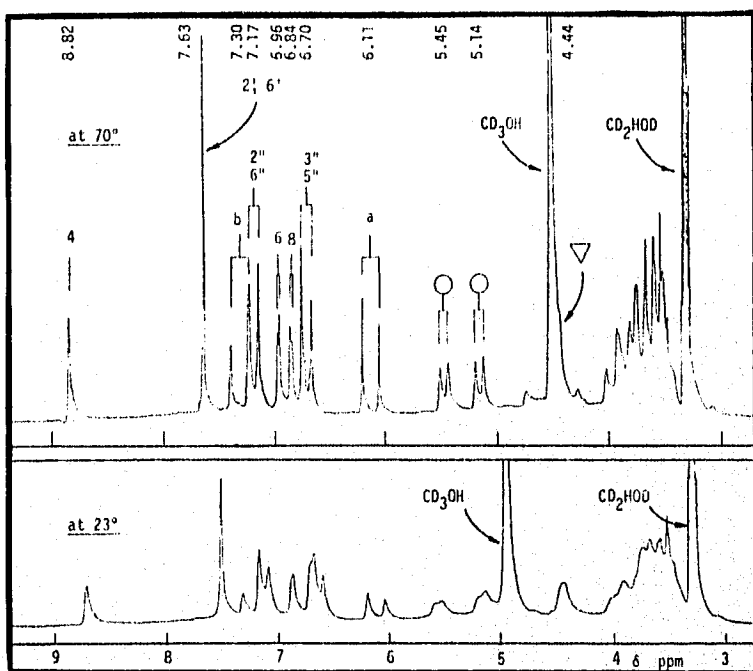


FIGURA 2. Espectro RMN del cloruro de awobanina (T. Goto et al (21)).

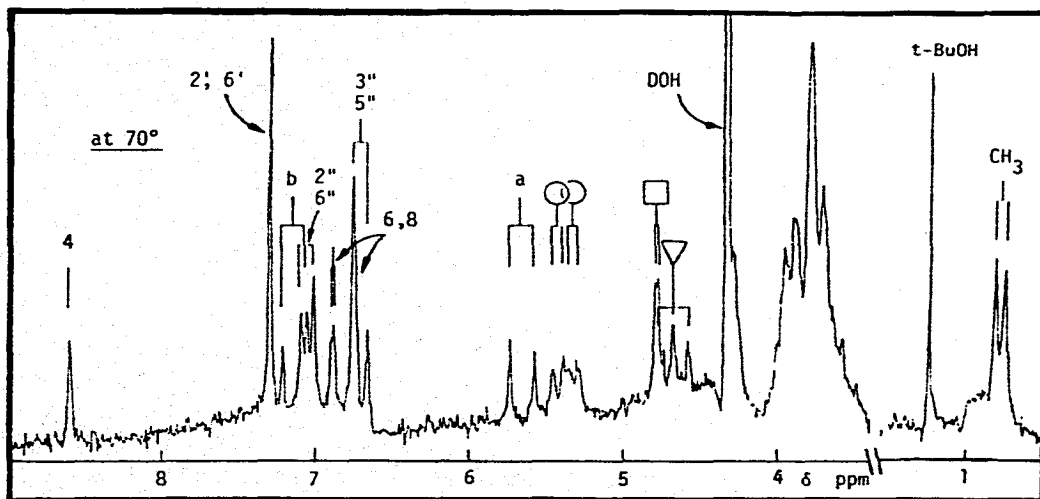


FIGURA 3. Espectro RMN del cloruro de violanina (T. Goto et al (21)).

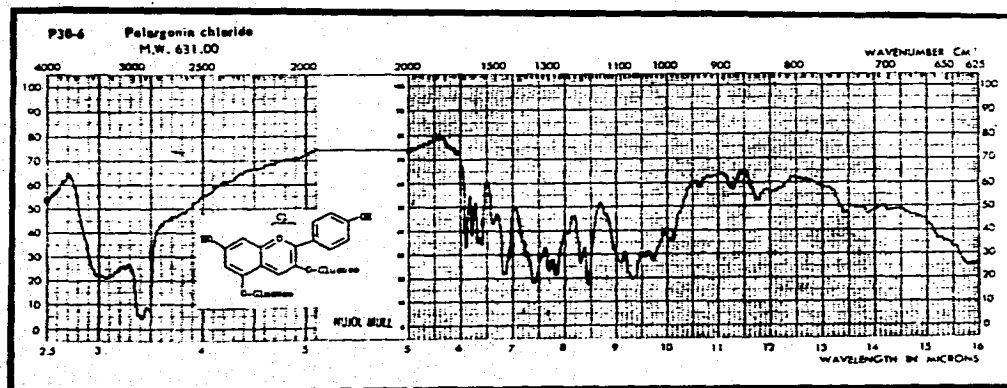


FIGURA 4. Espectro del cloruro de pelargonina (C. J. Pouchert (39)).

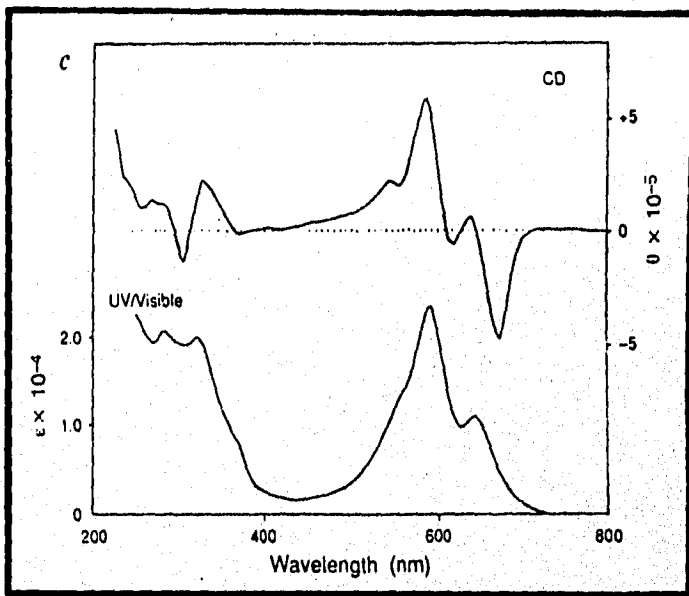


FIGURA 6. Espectros CD (dicroísmo circular) y UV-VIS correspondiente al pigmento de las flores de *Commelina communis* (T. Kondo et al (27)).

A P E N D I C E I I

A P E N D I C E I I

A. QUIMICA ANALITICA DEL HIERRO.

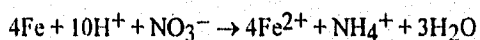
El hierro se ubica en el subgrupo IIIA, junto con los elementos cromo, titanio, uranio, circonio, torio, lantánidos, cerio, aluminio, vanadio y berilio. En el Sistema Periódico se encuentra en el Grupo VIII de transición, junto con el cobalto y el níquel. Tiene una estructura cortical externa que responde a la expresión $3d^6, 4s^2$. Ordinariamente funciona con los grados de oxidación (II) y (III) originando compuestos ferrosos y férricos, respectivamente, y en casos excepcionales como Fe (IV), muy poco estable, y como Fe (VI) (ferratos).

Considerando su relevancia en el reino vegetal, actualmente se admite que el hierro juega una importante acción catalítica en la producción de la clorofila, hasta el punto de poder afirmar que allí donde crezcan plantas verdes hay hierro en el suelo.

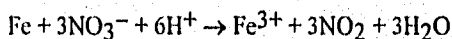
A1. PROPIEDADES REDOX.

La figura 1 (véase al final de esta sección) representa el diagrama potencial vs pH del hierro.

Con HNO_3 diluido se puede llevar a efecto la disolución del elemento sin desprendimiento de gas y formación de los cationes ferroso y amonio:



Con HNO_3 más concentrado se forma catión férrico:



El potencial del sistema Fe (III)/Fe (II) es bastante elevado en medio ácido ($E^\circ = 0.77 \text{ V}$), pero disminuye rápidamente al aumentar el pH por estabilizarse el Fe^{3+} en

forma de hidróxido. En el diagrama se expresa esta variación. Se observa que en medio alcalino el sistema se hace tan reductor que el Fe (II), estable en medio ácido, es oxidado rápidamente por el oxígeno disuelto o por el ambiental.

A2. Fe (II).

Las sales de Fe (II), ferrosas, son de color verde cuando están cristalizadas o en disoluciones concentradas; si éstas son diluídas pueden aparecer como incoloras. En forma anhidra son blancas o amarillas.

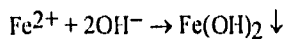
El Fe (II) es un catión poco ácido, que sería muy estable en solución acuosa si se impidiese su lenta oxidación a Fe^{3+} . Precipita el hidróxido $\text{Fe}(\text{OH})_2$ a valores de pH próximos a 8 y no presenta carácter anfótero marcado, si bien en medios muy alcalinos existen en bajas concentraciones las especies aniónicas FeO_2H^- y FeO_2^{2-} . También se conocen las especies FeOH^+ y $\text{Fe}(\text{OH})_2$.

Los compuestos más insolubles son: $\text{Fe}(\text{OH})_2$, blanco o ligeramente verdoso; FeCO_3 , blanco; $\text{Fe}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ azul oscuro (azul de Turnbull); FeO , negro y FeS , negro.

Forma complejos de gran estabilidad con ciertos derivados heterocíclicos nitrogenados como la o-fenantroliina y el α - α' -dipiridilo, que se emplean como indicadores redox y que poseen un fuerte color rojo; también forma complejos muy estables con algunas oximas, entre las que destaca el que origina con la dimetilgloxima, de color rojo oscuro, empleado como indicador redox en medio amoniacal y como reactivo de identificación del Sn^{2+} . Complejos menos estables son

los que origina con etilendiamina y con tartratos, citratos, oxalatos y, en general, con compuestos orgánicos polihidroxilados.

Hidróxidos alcalinos fuertes. En ausencia de oxígeno disuelto, incluso atmosférico, el Fe (II) origina un precipitado blanco de hidróxido:



En presencia de oxígeno disuelto, o del ambiental, el hidróxido se va oxidando lentamente a férrico, pasando por colores verdoso claro, verde oscuro, negro (de hidróxido ferroso-férrico) y, finalmente, pardo de hidróxido férrico. Esta oxidación, naturalmente, es más rápida en presencia de peróxidos.

El precipitado no es soluble en exceso de reactivo. Se disuelve fácilmente en ácidos, incluso muy débiles.

Ensayo a la gota con o-fenantrolina (1-10-fenantrolina). Sobre la placa de ensayos se trata una gota del problema con otra del reactivo y otra de amoníaco para reducir la acidez hasta que el medio sea débilmente ácido, o bien, débilmente alcalino. Color que va del rosa al carmín, indica ion ferroso. El reactivo -clorhidrato de 1-10-fenantrolina- se prepara en solución acuosa al 2 %.

Interfieren seriamente Ag, Bi, Cu, Ni y Co, también los percloratos; la interferencia de otros iones es de menor importancia y es desestimable si las concentraciones no exceden la del hierro *.

A3. Fe (III).

Los compuestos de Fe (III) son más abundantes e importantes, analíticamente, que los ferrosos. El Fe^{3+} es incoloro, si bien las soluciones de Fe (III) casi siempre

presentan color amarillo debido a las especies básicas $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, etc. Por otra parte, el color puede cambiar dada la facilidad con la que el catión forma complejos con numerosos aniones y grupos orgánicos diversos. Así, el cloruro y el cianuro intensifican el color amarillo del catión libre; el fluoruro, fosfato y el pirofosfato lo decoloran; el acetato origina un complejo rojizo; el tiocianato, de color rojo oscuro; el nitroprusiato, anaranjado; el malato, verde; el sulfosalicílico, violeta, el AEDT aumenta el color amarillo en medio ácido y se torna en rojo rubí en medio anoniacal.

El Fe^{3+} es un catión más ácido que el Fe^{2+} ; en consecuencia, necesita mayor acidez para su estabilización en medio acuoso. Se conocen las especies básicas $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$ y $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, cuya concentración puede ser importante en medios poco ácidos y pueden precipitar sales básicas de color pardo rojizo.

A valores de pH próximos a 2 precipita el hidróxido $\text{Fe}(\text{OH})_3$ -en realidad es un óxido hidratado- también de color pardo rojizo, que es estable en medios alcalinos. En medios muy alcalinos pueden existir bajas concentraciones de la especie $\text{Fe}(\text{OH})_6^{3-}$ - no se representa en la figura 1 por desconocerse la correspondiente constante- en equilibrio con el sólido $\text{Fe}(\text{OH})_3$. La elevación de la temperatura y la dilución favorecen la hidrólisis y, en consecuencia, algunas sales férricas de ácido débil, acetato por ejemplo, precipitan cuantitativamente una sal básica al diluir y someter a ebullición.

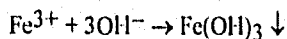
Se conocen los óxidos Fe_2O_3 , pardo rojizo y Fe_3O_4 , negro. El último es un óxido ferroso férrico (magnetita). Las sales más corrientes solubles en agua son:

cloruro, sulfato, nitrato, acetato, bromuro, perclorato y alumbre de hierro (III) y amonio. Todas son de color amarillo claro o amarillo parduzco, excepto el alumbre, que es violeta pálido.

Entre los compuestos más insolubles citados por orden de insolubilidad, se encuentran: Fe_2S_3 , $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$, $\text{Fe}(\text{OH})_3$ y FePO_4 .

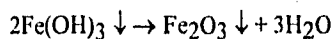
Ya se ha dicho que el Fe (III) tiene gran tendencia a formar complejos bastante estables. Algunos, por su fuerte coloración (los que forma con el tiocianato, ácido sulfosalicílico, ferrón) se utilizan en reacciones de identificación del catión. Otros, como los que origina con el anión fluoruro, fosfato, pirofosfato, tartrato, citrato, glicerina, manita y, en general, compuestos orgánicos polihidroxilados, para enmascarar el Fe^{3+} evitando ciertas reacciones o precipitaciones. También forma complejos muy estables, particularmente en medio alcalino, con el AEDT y similares, que han sido objeto de aplicaciones analíticas en volumetrías, y para aumentar la selectividad en separaciones por precipitación. El complejo que origina con el anión cianuro $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ es tan estable e inerte que el Fe^{3+} ya no reacciona con ninguno de sus reactivos; para identificar el catión en el ferricianuro es necesario destruir éste por la acción del ácido sulfúrico concentrado, o por calcinación.

Hidróxidos alcalinos fuertes. Estos originan precipitado pardo rojizo, gelatinoso, de $\text{Fe}(\text{OH})_3$:



Los fluoruros alcalinos, tartratos, citratos, malatos y, en general, las sustancias orgánicas polihidroxiladas, inhiben la precipitación del hidróxido. En medio ácido la

inhibición de la precipitación por los polialcoholes es sólo aparente; se forman coloides invisibles a simple vista, pero no hay una verdadera disolución por formación de complejos; en medio alcalino se forman complejos mixtos más estables que el hidróxido y la disolución es real. El AEDT no evita la precipitación del hidróxido. El $\text{Fe}(\text{OH})_3$ no es soluble en exceso de reactivo. Se disuelve fácilmente en los ácidos, excepto si se ha calcinado previamente, porque la calcinación le transforma en sexquióxido, difícilmente soluble:



Ensayo a la gota con KSCN. En medio ácido origina color rojo intenso de complejos tiocianato -desde $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ hasta $\text{Fe}(\text{SCN})_6^{3-}$, dependiendo de la concentración de SCN^- , extraíbles en éter.

A medio ml del problema ácido añadir 3 gotas del reactivo y agitar. Color rojo intenso (o rosa si la concentración de Fe^{3+} es pequeña) indica la presencia de ion férrico.

Reacción sensible -por la intensidad del color, no por la estabilidad de los complejos, que es baja-, pero perturbada por numerosos factores: los oxidantes fuertes destruyen el reactivo, por lo que es necesario adicionar un exceso de éste; NO_2^- y HNO_3 concentrado producen también color rojo; los iones que formen complejos estables con Fe^{3+} impiden la reacción, particularmente los fluoruros; Hg^{2+} , que forma complejos con SCN^- , obliga a la adición de un exceso de reactivo; Ti^{4+} . Mo (IV),

Co^{2+} y Cu^{2+} dan también complejos coloreados solubles en éter. El Bi^{3+} y el U (VI) dan color amarillo, no extraíble en éter.

El reactivo es preparado como una solución acuosa saturada de KSCN o de NH_4SCN .

F. Burriel et al (6).

*. A. J. Vogel (46).

B. METODOLOGIA PARA DETERMINAR EL CONTENIDO DE HIERRO EN ALIMENTOS.

El método analítico propuesto está basado en la intensidad de color. El hierro muestral se trata con ciertos reactivos que formen un compuesto colorido con aquél. El compuesto absorbe luz más fuertemente a la longitud de onda correspondiente a 510 nm. Puesto que la luz de tal longitud de onda es azul-verde, la luz no absorbida que será la que percibimos visualmente en solución es naranja a rojo. Emplearemos el principio de que la intensidad de la luz absorbida es proporcional a la concentración de hierro en solución, de acuerdo con la Ley de Beer (determinación espectrofotométrica).

En general, es necesario disponer de los siguientes reactivos:

-Un reactivo que sirva para ajustar el pH entre 4 y 6 (una solución elaborada con 10 g de acetato de sodio en 100 ml de agua* resultaría útil).

-Un reactivo que convierta todo el hierro (III) a hierro (II) (10 g de cloruro de hidroxilamonio en 100 ml de agua *).

-Un reactivo que forme con el Fe^{2+} un compuesto colorido en el rango de pH indicado (100 mg o-fenantrolina/100 ml agua*).

La secuencia de trabajo para la cuantificación del hierro en una muestra de alimento es la siguiente:

1. Calcinar una muestra de alimento, pesada previamente, en un crisol, hasta total descomposición.
2. Tratar la muestra calcinada con ácido, filtrarla y añadir el reactivo que genere el compuesto color rojo correspondiente. Diluir y aforar en un matraz volumétrico de 100 ml.
3. Mídase la absorbancia de la solución.
4. Utilizar una curva de calibración con soluciones de concentración conocida de Fe^{2+} .
5. Calcúlese la cantidad de hierro presente en la muestra y en una cantidad estándar.

Para preparar una solución patrón de hierro (II) se requieren 0.0702 g de sulfato ferroso de amonio, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, transferidos cuantitativamente a un matraz volumétrico de un litro y añadiendo agua suficiente para disolver la sal. Se le adiciona

2.5 ml de H_2SO_4 concentrado y se afora hasta la marca de un litro. La concentración de esta solución es de 10 ppm de hierro *.

Las soluciones para la curva de calibración -de acuerdo a la metodología propuesta- se elaboran variando desde 1 ml de solución patrón de hierro hasta 25 ml de ésta en sendos matraces volumétricos de 100 ml, que tendrán adicionados -incluido el de la muestra problema- 1 ml de del cloruro de hidroxilamonio, 5 ml de o-fenantrolina y 8 ml del acetato de sodio. El agua destilada puede funcionar como blanco *.

R. G. Silberman et al (43).

* G. D. Christian (9).

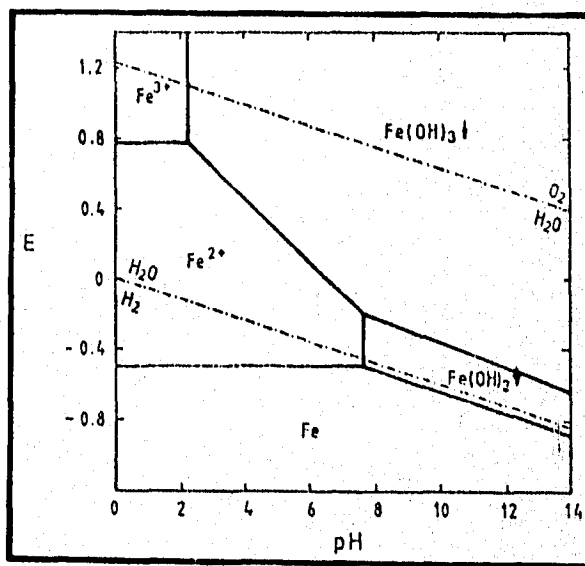


FIGURA 1. Diagrama de potencial vs pH correspondiente al hierro $C=0,01 \text{ M}$ (F.

Burriel et al (6).

BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar A. et al: HERBARIO MEDICINAL DEL I.M.S.S. INFORMACION ETNOBOTANICA. Ed. Redacta. México, 1994, apéndice.
2. Badui Dergal, S.: QUIMICA DE LOS ALIMENTOS. 2a. Edición. Ed. Alhambra Mexicana. México, 1990, pp 379-403.
3. Belitz, H. D. & Grosch, W.: QUIMICA DE LOS ALIMENTOS. Ed. Acribia. España, 1988, pp 649-651.
4. Brouillard, R.: ORIGIN OF THE EXCEPTIONAL COLOUR STABILITY OF ZEBRINA ANTHOCYANIN. *Phytochemistry*. 1981, 20, pp 143-145.
5. Bruneton, J.: ELEMENTOS DE FITOQUIMICA Y DE FARMACOGNOSIA. Ed. Acribia. España, 1991, pp 173-176.
6. Burriel, F. et al: QUIMICA ANALITICA CUALITATIVA. 14a. Edición. Ed. Paraninfo. España, 1992, pp 246-248, 250, 262-264, 266-268, 578-591.
7. Caballero, Y., Azpeitia, G., Fernández, G.: CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE *JUSTICIA SPICIGERA SCHLECHT*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Octubre-noviembre '95, vol. 26, no. 4, pp 125-126.
8. Chichester, C. O.: ADVANCES IN FOOD RESEARCH. THE CHEMISTRY OF PLANT PIGMENTS. Supplement 3. Academic Press. U.S.A., 1972, pp 123-142.
9. Christian, G. D.: ANALYTICAL CHEMISTRY. 5th. Edition. Ed. John Wiley & Sons. U.S.A., 1994, pp 723, 724.
10. Counsell, J. N.: NATURAL COLOURS FOR FOOD AND OTHER USES. Applied Science Publishers LTD. Great Britain, 1981, pp 125, 126, 129, 132, 133, 150, 151.

11. Cruess, W. V.: COMMERCIAL FRUIT AND VEGETABLE PRODUCTS. A TEXTBOOK FOR STUDENT, INVESTIGATOR AND MANUFACTURER. 3rd. Edition. McGraw-Hill Book Company Inc. U.S.A., 1948, pp 829-846.
12. Davies, D. D. et al: BIOQUIMICA VEGETAL. Ed. Omega. México, 1969, pp 452-463.
13. de Man, J. M.: PRINCIPLES OF FOOD CHEMISTRY. 3rd. Edition. The Avi Publishing Company Inc. U.S.A., 1980, pp 203-225.
14. DICTIONARY OF ORGANIC COMPOUNDS. 4th. Edition. Eyre & Spottiswoode Publishers LTD. Great Britain, 1965, pp 264, 549, 550, 764, 832, 833, 1622, 2050, 2051, 2567, 2612, 2613, 2641, 2647.
15. Domínguez, X. A.: METODOS DE INVESTIGACION FITOQUIMICA. Ed. Limusa. México, 1979, pp 81-88.
16. Euler, K. L. & Alam, M.: ISOLATION OF KAEMPFERITRIN FROM *JUSTICIA SPICIGERA*. J. of Natural Products 1982, vol. 45, num. 2, pp 211-212.
17. Fennema, O. R.: QUIMICA DE LOS ALIMENTOS. 2a. Edición. Ed. Acribia. España, 1993, pp 615-648.
18. Fessenden, R. J. & Fessenden, J. S.: QUIMICA ORGANICA. Ed. Iberoamerica. México, 1983, pp 935-938.
19. Garard, I. D.: INTRODUCTORY FOOD CHEMISTRY. 2nd. edition. The Avi Publishing Company Inc. U.S.A., 1978, pp 271-273.
20. Goodwin, T. W.: CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF PLANT PIGMENTS. 2nd. Edition. Vol. II. Academic Press Inc. U.S.A., 1976, pp 166-204.

21. Goto, T. et al: PMR SPECTRA OF NATURAL ACYLATED ANTHOCYANINS. DETERMINATION OF STEREOSTRUCTURE OF AWOBANIN, SHISONIN AND VIOLANIN. *Tetrahedron Letters*, 1978, 27, pp 2413-2416.
22. Harbone, J. B.: PHYTOCHEMICAL METHODS. A GUIDE TO MODERN TECHNIQUES OF PLANT ANALYSIS. 2nd. Edition. Chapman & Hall. U.S.A., 1984, pp 61-68.
23. Herbario Medicinal del I.M.S.S.: LA HERBOLARIA MEXICANA ACTUAL. Cartel de la Sala de Exposición.
24. Herbario Medicinal del I.M.S.S.: COLECCIONES DEL HERBARIO (GENEROS *JACOBINIA* Y *JUSTICIA*).
25. Hernández, F.: HISTORIA DE LAS PLANTAS DE NUEVA ESPAÑA. Tomo I. Imprenta Universitaria. México, 1942, pp 235-237.
26. King, R. D.: DEVELOPMENTS IN FOOD ANALYSIS TECHNIQUES. Vol. II. Applied Science Publishers LTD. Great Britain, 1980, pp 93-103.
27. Kondo, T. et al: STRUCTURAL BASIS OF BLUE COLOUR DEVELOPMENT IN FLOWER PETALS FROM *COMMELINA COMMUNIS*. *Nature*, 6 August 1992, vol. 358, no. 6386, pp 515-518.
28. Lee, H. S.: CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF ANTHOCYANINS. *J. of Chromatography*. 1992, 624, pp 221-232.
29. Linares, E. et al: SELECCION DE PLANTAS MEDICINALES DE MEXICO. Ed. Limusa. México, 1988, pp 64, 65.

30. Mabry, T. M. & Ulubelen, A.: CHEMISTRY AND UTILIZATION OF PHENYLPROPANOIDS INCLUDING FLAVONOIDS, COUMARINS AND LIGNANS. *J. Agric. Food Chem.* 1980, 28, pp 188-196.
31. Marmion, M. D.: HANDBOOK OF U.S. COLORANTS. FOOD, DRUGS, COSMETICS AND MEDICAL DEVICES. 3rd. Edition. Ed. John Wiley & Sons Inc. U.S.A., 1991, pp 188, 190, 191.
32. Mazza, G. & Brouillard, R.: COLOR STABILITY AND STRUCTURAL TRANSFORMATIONS OF CYANIDIN 3,5-DIGLUCOSIDE AND FOUR 3-DEOXYANTHOCYANINS IN AQUEOUS SOLUTIONS. *J. Agric. Food Chem.* 1987, 35, pp 422-426.
33. McCance & Widdowson's.: THE COMPOSITION OF FOODS. 5th. Edition. The Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. United Kingdom, 1992, pp 266, 276.
34. Merck & Co., Inc.: THE MERCK INDEX. 9th. Edition. U.S.A., 1976, pp 350, 377, 742, 916, 926, 931.
35. Meyer, L. H.: FOOD CHEMISTRY. Reinhold Publishing Corp. U.S.A., 1960, pp 241-247.
36. Mompradé, E.L. & Gutiérrez, T.: HISTORIA GENERAL DEL ARTE MEXICANO. INDUMENTARIA TRADICIONAL INDIGENA. Ed. Hermes. España, 1976, pp 15-19.
37. Ody, P.: LAS PLANTAS MEDICINALES. Javier Vergara Ed. Italia, 1993, p 19.

38. Ott, D. B.: MANUAL DE LABORATORIO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS. Ed. Acribia. España, 1992, pp 161-174.
39. Pouchert, C. J.: THE ALDRICH LIBRARY OF INFRARED SPECTRA. 3rd. Edition. U.S.A., 1991, pp 673, 1417.
40. Robinson, T.: THE ORGANIC CONSTITUENTS OF HIGHER PLANTS. Their chemistry and interrelationships. 5th. Edition. Cordus Press. U.S.A., 1983, pp 191-221.
41. Sánchez, O.: LA FLORA DEL VALLE DE MEXICO. 6a. Edición. Ed. Herrero. México, 1980, pp 311, 368, 369, 372.
42. Shriner, R. L. et al: IDENTIFICACION SISTEMATICA DE COMPUESTOS ORGANICOS. Ed. Limusa. México, 1982, pp 464, 475.
43. Silberman, R. G. et al.: LABORATORY MANUAL. CHEMISTRY IN CONTEXT. Applying chemistry to society. WCB. U.S.A., 1994, pp 23-1-23-4.
44. Streitwieser, A. & Heathcock, C. H.: QUIMICA ORGANICA. Ed. Interamericana. México, 1985, pp 1143-1146.
45. Villafaña Rojas J. et al: PRECIPITACION DE COMPLEJOS METALICOS DE ANTOCIANINA A PARTIR DE *RUBUS FRUCTICOSUS*. Rev. Soc. Quím. 1994, vol. 38, no.5, p 284.
46. Vogel, A. I.: QUIMICA ANALITICA CUANTITATIVA. Vol II. 2a. Edición. Ed. Kapelusz. Argentina, 1969, pp 901-905.