



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LAS
ANTOCIANINAS ACILADAS OBTENIDAS DEL
CAMOTE MORADO, EL RÁBANO Y LA
CAMPANILLA ROJA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA
ALINA MARÍA CHÁVEZ MIRANDA



MÉXICO, D.F.

2014



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: ARTURO NAVARRO OCAÑA

VOCAL: JOSÉ GUILLERMO DE JESÚS AGUILAR OSORIO

SECRETARIO: BERTHA JULIETA SANDOVAL GUILLÉN

1er. SUPLENTE: JOSÉ GUADALUPE DE LA ROSA CANALES

2º SUPLENTE: GUILLERMINA YAZMÍN ARELLANO SALAZAR.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

L-321 Departamento de Alimentos y Biotecnología. Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: ARTURO NAVARRO OCAÑA

SUSTENTANTE: ALINA MARÍA CHÁVEZ MIRANDA

ÍNDICE

Introducción	1
1. Marco teórico	3
1.1 Colorantes naturales	3
1.2 Antocianinas como colorantes naturales.....	5
1.3 Química de las antocianinas	6
1.4 Antocianinas aciladas.....	8
1.5 Factores que afectan la estabilidad	10
1.5.1 pH	10
1.5.2 Temperatura.....	12
1.5.3 Luz	12
1.5.4 Oxígeno	13
1.5.5 Enzimas	13
1.6. Métodos de extracción y purificación	15
1.6.1 Método de extracción simple.....	15
1.6.2 Métodos de purificación y análisis	15
1.7. Métodos de identificación	17
1.7.1 Espectrometría de masas	17
1.7.2 Resonancia magnética nuclear	18
1.8. Función biológica de las antocianinas.....	18
1.8.1 Actividad antioxidante	19
Hipótesis y objetivos	20
2. Metodología	21
3. Materiales y métodos	27
3.1. Equipos y muestras.....	27
3.2. Datos de las muestras.....	28
3.3. Métodos de análisis.....	28
3.3.1 Determinación de antocianinas totales	28
3.3.2 Cromatografía en capa fina.....	29
3.3.3 Cinética de degradación térmica.....	29
3.3.4 Medición instrumental de color.....	30
3.2.6 Análisis estadístico.....	31

4. Resultados y discusión	32
4.1. Antocianinas totales	32
4.2. Cromatografía en capa fina.....	33
4.3. Perfil de antocianinas en HPLC.....	36
4.4. Estabilidad a la temperatura y el pH.....	41
4.4.1 Cinética de degradación térmica.....	46
4.4.2 Degradación térmica del color.....	50
4.5. Estabilidad a la luz	55
4.5.1 Degradación de color	57
4.6. Estabilidad de las antocianinas en bebidas.....	60
4.7. Estabilidad de las antocianinas en gelatinas	62
Conclusiones	64
Bibliografía	66
Anexos	71

INTRODUCCIÓN.

El color juega un papel importante en la aceptabilidad de los alimentos. Los consumidores juzgan primero la calidad de un producto por su color, la industria alimentaria ha usado por años colorantes para mejorar o preservar la apariencia original de los alimentos.

Debido a los posibles problemas que causan a los seres humanos los pigmentos sintéticos, como su toxicidad y carcinogenicidad, ha disminuido el uso de estos y ha aumentado el interés en los pigmentos naturales que además de funcionar como colorantes, tienen efectos benéficos para la salud.

En los pigmentos naturales se incluyen diferentes tipos de compuestos como las antocianinas, carotenoides, betalaínas y clorofilas.

Las antocianinas son un grupo diverso de pigmentos intensamente coloridos responsables del color anaranjado, rojo, morado y azul de muchas frutas, vegetales, flores, hojas, raíces, etc. Son solubles en agua lo que facilita su incorporación a los alimentos y se han consumido por años sin tener algún efecto negativo.

La presencia de uno o más grupos acilo en una molécula de antocianina, dificulta la hidrólisis de ion flavilio permitiendo preferentemente la formación de las bases quinooidales azules, resultando pigmentos que son menos sensitivos a los cambios de pH. Los pigmentos acilados son más estables a la luz, la temperatura y el pH que sus análogos no acilados.

En este proyecto se obtuvo el extracto rico de antocianinas obtenidos a partir del camote, el rábano y la campanilla para realizar una identificación parcial del perfil de antocianinas mediante HPLC y cromatografía en capa fina.

Con el propósito de obtener un extracto rico en antocianinas que sea estable para su uso en la elaboración de alimentos, se evaluó la degradación de las antocianinas, a valores de pH entre 3 y 7, temperaturas entre 60°C y 90°C así como su estabilidad a la luz. También se midió la degradación de color con un espectrofotómetro Minolta CM-3600d

Para poder predecir la manera en que se verá afectada la estabilidad de las antocianinas al modificar el pH y la temperatura, se determinó el orden de

reacción de la degradación de las antocianinas, la constante de reacción (k), el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) y la energía de activación (E_a).

Se aplicó el colorante durante la elaboración de bebidas y gelatinas y se evaluó la degradación de las antocianinas mediante la determinación de las antocianinas totales durante 6 semanas con el propósito de evaluar su estabilidad en diferentes matrices alimentarias.

1. MARCO TEÓRICO

El estudio de los colorantes vegetales es una amplia área de investigación debido a la creciente demanda de los consumidores por productos que contengan ingredientes naturales.

Las antocianinas (del griego *anthos* que significa flor y *kyanos* que significa azul) son los pigmentos más importantes de las plantas; son inocuos y su fácil incorporación a los medios acuosos los hace interesantes para uso como colorantes naturales en alimentos. Estos pigmentos son los responsables del color naranja, rosa, rojo, violeta y morado de las flores y frutas de algunas plantas; también están presentes en otros tejidos como en las raíces, tubérculos y tallos (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

A diferencia de los pigmentos sintéticos, las antocianinas no son estables especialmente en soluciones alcalinas y neutras, ocurriendo fácilmente cambios durante el procesamiento del material crudo y el almacenamiento, los que manifiestan pérdida de color, oscurecimiento del producto y formación de precipitados en los extractos.

Entre sus funciones biológicas en la planta está el de atraer insectos y pájaros para los procesos de polinización y diseminación de las semillas.

Otra propiedad importante es su actividad antioxidante, que juega un rol vital en la prevención de enfermedades neuronales y cardiovasculares, el cáncer, la diabetes, entre otras. (Bridle y Timberlake, 1997)

1.1 COLORANTES NATURALES.

La calidad de los alimentos, además de sus características microbiológicas, se basa en general en el color, sabor, textura y valor nutritivo. Dependiendo del alimento en particular, estos factores pesan en grado diverso al evaluar la calidad global.

Uno de los más importantes atributos de calidad sensorial de un alimento es el color. Esto se debe, con independencia de su valor nutritivo, sabor o textura, a que es poco probable que se consuma un alimento a menos que tenga el color correcto (Fennema, 1996).

Los colores de los alimentos se deben a distintos compuestos, principalmente orgánicos, algunos que se producen durante su manejo y procesamiento, y otros que son pigmentos naturales o colorantes sintéticos añadidos.

La mayoría de los alimentos vegetales y las carnes le deben su color a sus correspondientes pigmentos, que son sustancias que tienen una función biológica muy importante en el tejido; este es el caso de la clorofila y la fotosíntesis, y de la mioglobina y el almacenamiento muscular del oxígeno, entre otros. Algunos de estos pigmentos se extraen de su estado natural y se emplean como colorantes en la elaboración de un gran número de alimentos.

Los pigmentos relacionados con los alimentos se pueden dividir en ocho categorías:

1. Carotenoides.
2. Clorofilas.
3. Antocianinas.
4. Flavonoides.
5. Betalaínas.
6. Taninos.
7. Mioglobina y hemoglobina.
8. Otros.

Los seis primeros se encuentran fundamentalmente en productos vegetales, aun cuando llegan a estar presentes en derivados de origen animal.

El séptimo grupo solo se encuentra en productos de origen animal.

En el octavo grupo se incluye un gran número de compuestos que también imparten color tanto a los tejidos vegetales como animales: en él se incluyen quinonas, xantonas, la vitamina riboflavina como tal y en sus diferentes formas de coenzimas, los citocromos, etc. Debido a que no son tan abundantes contribuyen poco al color de los alimentos.

La mayoría de los pigmentos vegetales se localizan en el protoplasma de las células, dentro de los organelos especializados llamados plastidos; en algunos casos, cuando son solubles en agua, se ubican disueltos en vacuolas de las células.

Algunos de ellos son hidrosolubles, y su separación y aislamiento se facilita considerablemente, pero existe otros que solo se solubilizan en disolventes orgánicos como hexano, éter, etc. (Badui, 1990)

Algunas fuentes de colorantes naturales permitidos para su uso en alimentos son las siguientes:

Antocianinas (E163): pigmentos de rojo a azules que se encuentran en frutas maduras (fresas, cerezas, uvas), vegetales (cebolla, col), semillas (girasol morado) y flores.

Betanina (E162): es el pigmento predominante en el betabel.

Color caramelo (E150): es el equivalente a la caramelización del azúcar, es obtenido mediante un cuidadoso calentamiento de carbohidratos en presencia de una catálisis.

Ácido carmínico (E120): es un extracto obtenido de la cochinilla. Se necesitan aproximadamente 70 000 insectos para producir 500g de laca de ácido carmínico al 50%.

Carotenoides (E160): pigmentos que están ampliamente distribuidos en la naturaleza (se ha estimado que la producción anual es de 100 millones de toneladas).

Algunos ejemplos de estos pigmentos son el β -caroteno (E160), bixina (E160b); que es un extracto obtenido de una semilla que crece en Sudamérica, el este de África y el Caribe; el licopeno (E160d) presente en los tomates, la sandía; la luteína (E161b) y la cantaxantina.

Clorofila (E140): pigmento verde que participa en el proceso de fotosíntesis.

Curcumina (E100): se extrae de una planta que crece principalmente en la India. (Wissgott y Bortlik, 1996)

1.2 ANTOCIANINAS COMO COLORANTES NATURALES.

Las antocianinas aciladas han mostrado ser una prometedora alternativa al uso de los colorantes sintéticos en los alimentos. Dependiendo de la estructura química de la antocianina y el pH de la matriz del alimento, se pueden alcanzar diferentes colores.

Por ejemplo, la pelargonidina del rábano en condiciones acidas tiene características de color parecidas al del rojo allura. Otras antocianinas aciladas

pueden dar tonalidades desde el rojo hasta el morado, dependiendo del pH. A pesar de que las antocianinas sufren transformaciones con el pH, y generalmente son más coloridas a pH menores de 3, tienen numerosas aplicaciones en alimentos con valores más altos de pH si se escoge el extracto correcto.

Se han realizado numerosos estudios que demuestran una relación entre el consumo de alimentos ricos en antocianinas y el mejoramiento de la salud (Wang *et al.*, 2010; Giordano *et al.*, 2011; Mazzaracchio *et al.*, 2011). En los últimos años ha aumentado el mercado de los alimentos nutracéuticos y medicinales, los consumidores están interesados en los alimentos que pueden ayudar a prevenir y reducir la incidencia de algunas enfermedades.

Es por esto que la identificación de los componentes de los extractos de antocianinas que ayudan a la salud incrementaría su demanda por los consumidores y la industria alimentaria como pigmentos naturales y abriría una nueva ventada de oportunidades para el uso de estos extractos en una gran variedad de alimentos (Giusti y Wrolstad, 2003).

1.3 QUÍMICA DE LAS ANTOCIANINAS.

Las antocianinas forman parte de un grupo grande de constituyentes de las plantas conocidos como flavonoides que poseen el mismo esqueleto característico C6-C3-C6 y el mismo origen biosintético, pero difieren en que absorben fuertemente en la región visible del espectro. (Cavalcanti *et al.*, 2011) Están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglucona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace β -glucosídico.

La estructura química básica de estas agluconas es el ion flavilio (figura 1) que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilo (A) y un anillo fenólico (B); por su posición trivalente del oxígeno, el flavilo normalmente funciona como un catión. Los hidratos de carbono que comúnmente se encuentran son la glucosa y la ramnosa, seguidos de la galactosa, la xilosa y la arabinosa y, ocasionalmente, la gentibiosa, la rutinosa y la soforosa: todos ellos se unen a la antocianidina principalmente por medio del hidroxilo de la posición 3, y en segundo término, de la 5 o de la 7. Cuando en una misma molécula se encuentran dos azúcares, estos se localizan en los hidroxilos 4 y 5, produciendo una estructura que

generalmente es más estable que cuando solo contienen un solo monosacárido. (Badui, 1990)

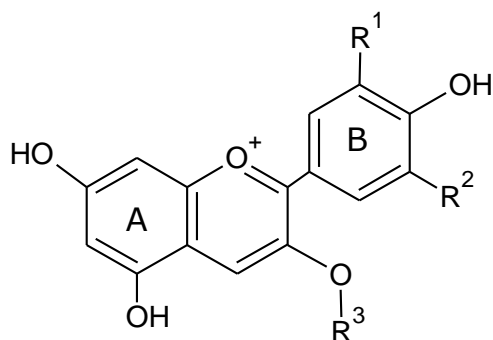


Figura 1. Estructura básica de todas las antocianinas.

Las antocianinas se pueden dividir en grupos que dependen del número de moléculas de azúcar. Los monósidos tienen solo un residuo de azúcar, casi siempre en la posición 3. Los biósidos contienen dos azúcares, bien ambos en posición 3 o uno en la posición 3 y otros en la posición 5, o más raramente en las posiciones 3 y 7. Los triósidos contienen 3 azúcares, ordinariamente dos en la posición 3 y uno en la posición 5, a menudo tres en una estructura ramificada o lineal en la posición 3, o más raramente, dos en la posición 3 y uno en la posición 7. No se han descrito antocianinas con cuatro restos de azúcares, pero hay cierta evidencia de su existencia. (Fennema, 1996)

La estructura química de las antocianinas influye en las propiedades químicas y determina la estabilidad, color, el equilibrio acuoso, efecto de copigmentación, la actividad antioxidante y la actividad biológica (Bueno et al., 2012).

Hay una gran variedad de antocianinas dispersas en la naturaleza, la diferencia principal entre ellas son: el número de grupos hidroxilados, la naturaleza y el número de azúcares unidos a su estructura, los grupos alifáticos o aromáticos unidos al azúcar en la molécula y la posición de estos enlaces. Hasta ahora se han reportado más de 500 diferentes antocianinas de las cuales solo seis son las más comunes en las plantas: la pelargonidina, peonidina, delphinidina, petunidina, malvidina y la cianidina (tabla1) (Bueno et al., 2012).

Tabla 1. Antocianinas comúnmente encontradas en la naturaleza. (Bueno *et al.*, 2012)

Antocianidina	Abrev.	R ₁	R ₂	λ_{max} (nm)*		Colores producidos
				R ₃ = H	R ₃ = gluc	
Delfinidina	Dp	OH	OH	546	541	Morado, azul
Petunidina	Pt	OH	OCH ₃	543	540	Morado
Malvidina	Mv	OCH ₃	OCH ₃	542	538	Morado
Cianidina	Cy	OH	H	535	530	Magenta, carmesí
Peonidina	Pn	OCH ₃	H	532	528	Magenta
Pelargonidina	Pg	H	H	520	516	Naranja salmón

*metanol-ácido clorhídrico (0.01%)

La distribución de las 6 antocianinas más comunes en las frutas y vegetales es: cianidina 50%, delfinidina 12%, pelargonidina 12%, peonidina 12%, petunidina 7% y malvidina 7%. En las frutas, las antocianinas existen principalmente en sus formas glicosídicas, y con la excepción de las moras azules, normalmente contienen antocianinas derivadas de una o dos bases (tabla 2)

Tabla 2. Antocianinas mayoritarias de algunas frutas. (Bueno *et al.*, 2012)

Fuentes vegetales	Antocianinas
Fresa, platano, rabano, papa	Pelargonidina
Manzana, zarzamora, baya, durazno, pera, higo, cereza, cebolla morada, grosella, col morada.	Cianidina
Grosella negra, naranja roja, col morada, zanahoria morada, semilla de frijol.	Cianidina y delfinidina.
Maracuyá, berenjena, frijol negro, granada.	Delfinidina
Arandano, ciruela, cereza dulce, camote morado.	Cianidina y peonidina
Arandano, uva roja	Petunidina y malvidina.
Mango	Peonidina

La mayoría de las antocianinas están glicosiladas en la posición 3-OH (3-O-monoglicosidos), lo que aumenta la estabilidad térmica y una posible acilación del residuo de azúcar con ácidos orgánicos.

1.4 ANTOCIANINAS ACILADAS.

Los azúcares de las antocianinas están unidos normalmente a las antocianinas a través de enlaces con el oxígeno (figura 2). La glicosilación de la antocianina

provoca una subsecuente O- acilación. La O- acilación, una modificación muy común, es la adición de un grupo acido (acilo) a el residuo de azúcar de la antocianina.

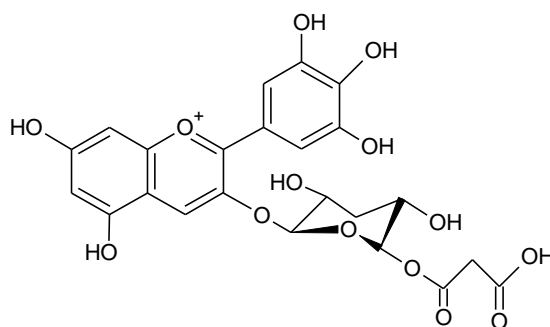


Figura 2. Estructura de la delphinidina-3-malonilglucosido.

Esta modificación es particularmente importante porque juega un rol significativo en la formación de las estructuras estabilizantes del pigmento. Más del 60% de las antocianinas reportadas tienen uno o más residuos acilados, y los colores y funciones de estos pigmentos en las plantas están altamente afectados por la naturaleza, el número, y la posición del enlace del grupo acilo.

Los agentes acilantes más frecuentes son los ácidos cafeico, ferúlico, sinápico y los ácidos p-cumáricos, los ácidos hidroxibenzoicos y ácidos alifáticos como el acético, málico, malónico, oxálico, succínico y tartárico. Los ácidos cinámicos y alifáticos comúnmente acilados con los residuos de azúcar de las antocianinas se muestran en la figuras 3 y 4 respectivamente.

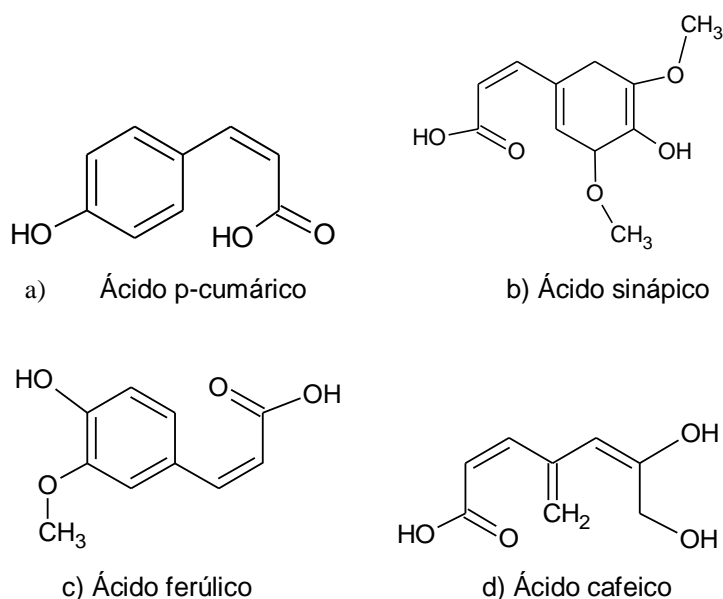


Figura 3. Ácidos cinámicos comúnmente acilados con los residuos de azúcar de las antocianinas

El ácido malónico, que está presente en 25% de las antocianinas, es el residuo acilo más frecuente en las antocianinas. En algunos casos se forman antocianinas muy complejas con múltiples grupos acilo y glicosilo.

La acilación de la molécula de antocianina aumenta su estabilidad a través de copigmentación intramolecular y/o intermolecular y reacciones de auto-asociación. Por este motivo, las fuentes de antocianinas aciladas pueden poseer la estabilidad deseada para la aplicación en alimentos (Bueno et al., 2012).

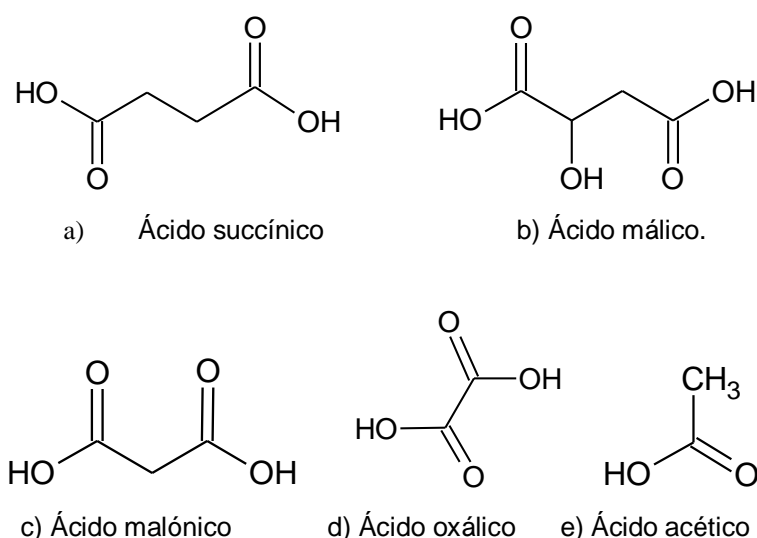


Figura 4. Ácidos alifáticos comúnmente acilados con los residuos de azúcar de las antocianinas

1.5 FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD.

Las antocianinas aisladas son altamente inestables y muy susceptibles a la degradación. Su estabilidad está afectada por diversos factores como el pH, la temperatura, su estructura, concentración, luz, oxígeno, disolventes y la presencia de enzimas, flavonoides, iones metálicos y proteínas.

El número de grupos hidroxilo y el tipo de residuo de azúcar, así como los grupos acilo, modifican la polaridad, el tamaño, la conformación individual y por lo tanto la estabilidad de las antocianinas. Los pigmentos acilados son más estables que aquellos que no lo están.

1.5.1 pH

Las antocianinas muestran gran susceptibilidad a los cambios de pH, se pueden encontrar en diferentes formas químicas dependiendo del pH de la solución.

En soluciones acuosas acidas las antocianinas existen como un equilibrio de 4 especies principalmente (figura 5): la base quinoidal (QB), el catión flavilio (FC), el carbinol o pseudobase (PB) y la chalcona (CH).

En condiciones acidas ($\text{pH} < 2$), las antocianinas existen principalmente en la forma del catión flavilio rojo (FC). Al aumentar el pH se pierde un protón produciendo la formación de la base quinoidal (QB), azul o violeta (Cavalcanti et al., 2011).

Al mismo tiempo ocurre la hidratación del catión flavilio (FC), generando la pseudobase (PB) que lentamente alcanza el equilibrio con la incolora chalcona (CH).

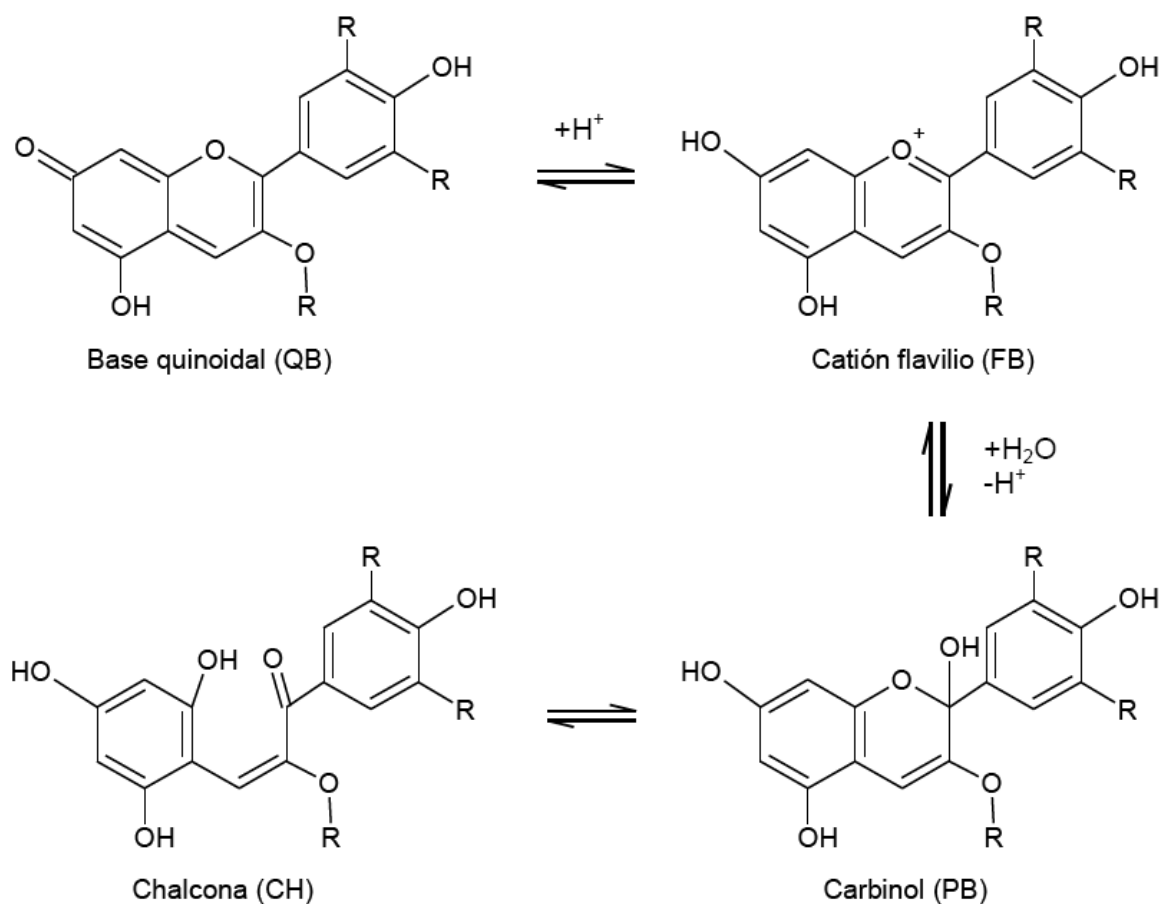


Figura 5. Equilibrio principal entre las diferentes formas de las antocianinas.

El color de la solución de antocianinas está determinado por las proporciones de las diferentes formas de las antocianinas.

La presencia de uno más grupos acilo en la molécula de antocianina obstaculiza la hidrólisis del catión flavilio rojo a la base carbinol incolora, permitiendo

preferentemente la formación de la base quinoidal azul dando como resultado la formación de pigmentos menos sensibles a los cambios de pH (Bridle y Timberlake, 1996)

1.5.2 Temperatura

La estabilidad de las antocianinas y de todos los pigmentos encontrados en los alimentos disminuye durante el procesamiento y el almacenamiento al aumentar la temperatura. Eventualmente, la degradación térmica genera productos cafés, especialmente con la presencia de oxígeno. (Cavalcanti *et al.*, 2011)

La combinación de operaciones unitarias que involucran un aumento de la temperatura como el escaldado, la pasteurización además de la duración del proceso afecta el contenido de antocianinas de frutas y vegetales.

La degradación térmica de las antocianinas da resultado a una variedad de especies dependiendo de la fuerza y la naturaleza del calentado.

El enlace aglicon-azúcar es más lábil que otros enlaces glicosídicos a pH 2-4. Se han encontrado diferentes productos de descomposición térmica de las antocianinas como glucosa, rutinosa, derivados de ácido benzoico entre otros.

1.5.3 Luz.

La luz afecta a las antocianinas de dos maneras: es esencial para la biosíntesis pero también acelera su degradación. Las antocianinas conservan su color mucho mejor cuando se mantienen en la oscuridad; ya se ha visto esta diferencia después de 24 horas de ser almacenadas en la luz en comparación a cuando se almacenan en la oscuridad.

Además se ha estudiado la estabilidad de las antocianinas bajo la luz neón y en la oscuridad por 24 semanas, mostrando que la luz decrece considerablemente el contenido de fenoles y antocianinas durante el almacenamiento (Cavalcanti *et al.*, 2011).

1.5.4 Oxígeno.

El oxígeno también juega un rol importante en el proceso de degradación. La presencia de oxígeno puede acelerar la degradación de las antocianinas

mediante un mecanismo oxidativo directo y/o mediante la acción de enzimas oxidantes.

En presencia de oxígeno, las enzimas como la polifenoloxidasas (PPO) catalizan la oxidación del ácido clorogénico en la correspondiente o-quinona. Esta quinona reacciona con las antocianinas formando productos cafés (Patras *et al*, 2010).

1.5.5 Enzimas

Varias enzimas que son endógenas en muchos tejidos de plantas han sido implicadas en la decoloración oxidativa de antocianinas. Estas enzimas han sido generalmente llamadas antocianinasas, pero basadas en su actividad se han identificado dos grupos distintivos:

Glucosidasas, las cuales hidrolizan enlaces glucosídicos de antocianinas para producir el azúcar libre y la aglicona; la cual es más inestable que la antocianina de donde proviene, por lo que su degradación es más rápida.

Polifenoloxidasas (PPO), en presencia de oxígeno estas enzimas catalizan la hidroxilación de los monofenoles en o-difenoles, y la oxidación de los o-difenoles para formar las correspondientes o-quinonas. Posteriormente mediante reacciones no enzimáticas, las o-quinonas dan formación a pigmentos poliméricos de color café.

En adición a la glucosidasa y PPO, también hay una degradación de antocianinas catalizada por la peroxidasa, la cual oxida las antocianinas por medio de peróxidos.

En la figura 6 se ilustra un posible mecanismo de la degradación de las antocianinas mediante la acción diferentes enzimas.

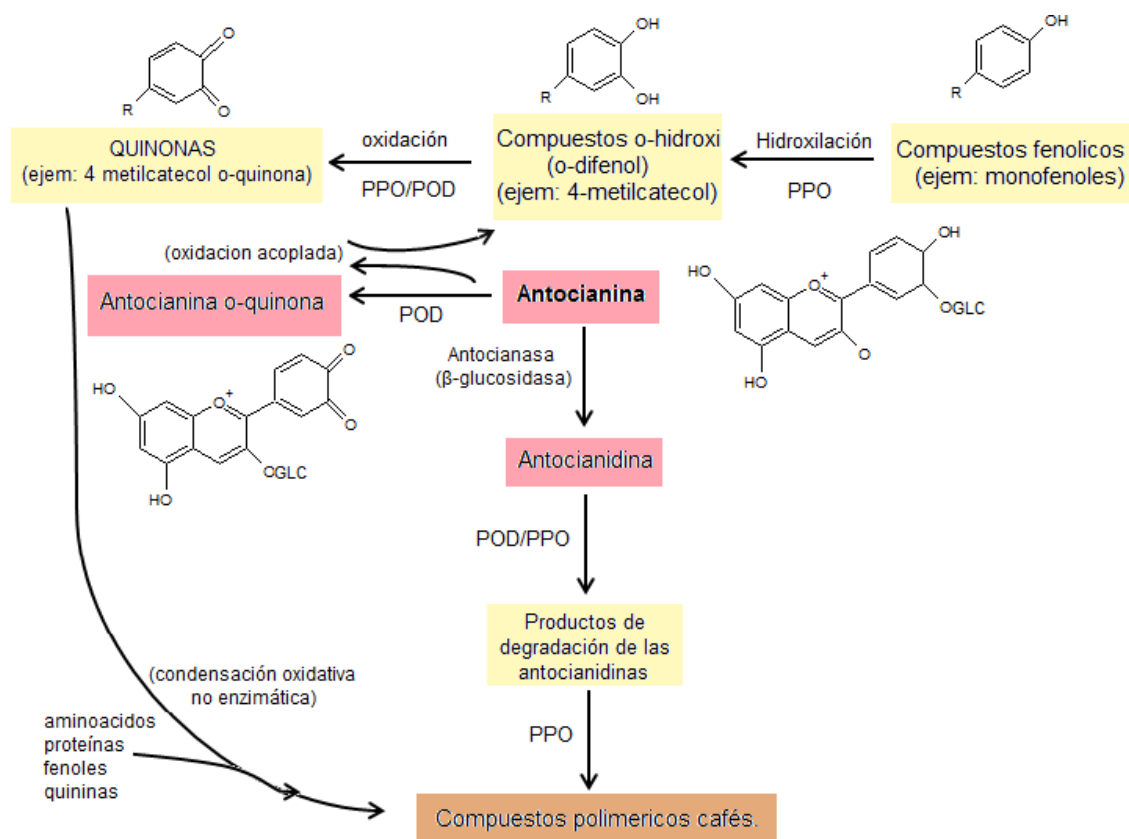


Figura 6. Esquema propuesto (Oren-Shamir, 2009) que describe la degradación de las antocianinas en donde POD, peroxidasa; PPO, polifenoloxidasa. La POD es dependiente del H₂O₂ mientras que la PPO depende del O₂. Se presentan tres rutas alternativas para la degradación enzimática de las antocianinas. (1) Oxidación acoplada: reducción de las quinonas de los compuestos fenólicos a los compuestos fenólicos originales en paralelo a la oxidación de antocianinas a quinonas. (2) degradación en dos pasos: ruptura del enlace glicosídico con β-glucosidasa y posteriormente la oxidación con PPO o POD. (3) Oxidación directa de las antocianinas con peroxidasa.

1.6 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN.

La extracción es un paso muy importante en la separación, identificación y el uso de las antocianinas. No existe un método de extracción estándar sin embargo la extracción con disolventes y la extracción con fluidos supercríticos son las técnicas más comunes para el aislamiento de compuestos fenólicos como las antocianinas.

Generalmente las antocianinas son extraídas moliendo, secando o liofilizando las frutas, vegetales y hojas o solamente remojando las muestras frescas y subsecuentemente realizando la extracción con solventes. Estas metodologías implican la extracción de sustancias no fenólicas como los azúcares, ácidos

orgánicos y proteínas, por lo que se requiere una subsecuente purificación. (Ignat *et al.*, 2011)

1.6.1 Método de extracción simple.

La extracción con disolventes es el método más común para la extracción de diversos compuestos que se encuentran en las frutas, incluyendo los flavonoides.

Las antocianinas son moléculas polares por lo que los disolventes más usados para su extracción son combinaciones acuosas de etanol, metanol o acetona.

Entre los métodos más comunes de extracción se encuentran también los que usan metanol o etanol acidificado como extractantes. A pesar de que la extracción con metanol es más eficiente, debido a su toxicidad, en la industria alimentaria se usa preferentemente el etanol.

Se debe tener cuidado en la extracción con disolventes acidificados para evitar un medio ácido fuerte porque las antocianinas aciladas pueden ser degradadas (reacción de hidrólisis) y en el caso de antocianinas 3-monosido se puede romper el enlace glicosídico. En el caso de la extracción con HCl al 0.1% en metanol también se obtienen agliconas, pero bajo estas condiciones no es posible saber si las agliconas estaban en la muestra o si la hidrólisis ocurrió durante la extracción.

Si se usa un medio con un ácido débil es posible extraer más y diferentes antocianinas. Además de la extracción con metanol y etanol acidificado, también se utilizan derivados del sulfuro como extractantes. (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

1.6.2 Métodos de purificación, análisis cuantitativo y cualitativo.

1.6.2.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

A pesar de los diferentes métodos disponibles, HPLC es el más utilizado para la separación y cuantificación de fenoles en las frutas, hortalizas, flores, etc. Las condiciones cromatográficas del método de HPLC incluyen el uso de una columna de fase reversa C18; un detector de UV-Vis, y un sistema binario de

solventes que contiene agua acidificada (disolvente A) y un solvente orgánico polar (disolvente B).

El método de HPLC presenta algunas limitaciones, especialmente en matrices complejas, como extractos crudos y muestras frescas; es por eso que se realiza una pre concentración y purificación para el análisis mediante HPLC. El propósito de la concentración es de simplificar los cromatogramas obtenidos para que se pueda obtener una identificación y cuantificación más segura. La etapa de purificación es crítica ya que con esta se eliminan componentes que pueden interferir con el análisis de las muestras.

1.6.2.2 Cromatografía con fluidos supercríticos (SFC)

La cromatografía con fluidos supercríticos (SFC) es una técnica cromatografía relativamente reciente que se usa para la identificación y separación de compuestos fenólicos. Lo que la hace diferente de otras técnicas cromatograficas es el uso de fluidos supercríticos como fase móvil.

La cromatografía con fluidos supercríticos es más versátil que la cromatografía de líquidos de alta resolución, tiene una mejor relación costo-eficiencia, fácil de usar, con mejor resolución y el análisis es más rápido que en todas las técnicas de cromatografía de líquidos. La instrumentación que se requiere para este método es muy versátil por la compatibilidad de su detector.

1.6.2.3 Otras técnicas cromatografías.

Para la purificación y separación de los compuestos fenólicos también se utilizan otras técnicas cromatografías. La cromatografía de capa fina (TLC) y la cromatografía en papel (PC) todavía son utilizadas para el aislamiento y purificación de compuestos usando diferentes sistemas de solventes.

La cromatografía en capa fina es una técnica con gran aplicación en el análisis de extractos de plantas. Tiene muchas ventajas como los bajos costos, poco tiempo de análisis, la posibilidad de detección múltiple, entre otras.

La cromatografía de gases es otra técnica que ha sido empleada para la separación e identificación de diferentes compuestos fenólicos; tiene una gran capacidad de separación y posee una alta sensibilidad y selectividad cuando se combina con la espectrometría de masas. Sin embargo la preparación de las

muestras para la cromatografía de gases es muy problemática ya que se tienen que eliminar los lípidos de las muestras y se tienen que liberar los compuestos fenólicos de los enlaces glicosídicos y éster. (Ignat *et al.*, 2011)

1.7 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

La identificación de las antocianinas tiene un rol crítico en los estudios taxonómicos y de adulteración además de la evaluación de la calidad de los alimentos crudos y procesados. Como las características espectrales de las antocianinas dan una información cuantitativa y cualitativa muy útil; actualmente la espectroscopia es la técnica utilizada principalmente debido a que es una técnica sencilla y tiene un bajo costo.

Debido a la dificultad de obtener compuestos de referencia y a que las antocianinas tienen espectros similares, la espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (NMR), se han convertido en las técnicas preferidas para la identificación de las antocianinas.

1.7.1 Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas es una técnica analítica que se utiliza para ilustrar las estructuras químicas de moléculas como los péptidos, polifenoles y otros compuestos químicos.

El principio de esta técnica consiste en ionizar los compuestos químicos para generar moléculas o fragmentos de moléculas cargadas y medir la proporción de masa para carga. Los principales tipos de ionización usados para el análisis de compuestos fenólicos son: bombardeo con átomos rápidos (FAB), electrospray (ESI), ionización a presión atmosférica (API) y la ionización por desorción láser en matriz asistida (MALDI). (Ignat *et al.*, 2011)

Recientemente se combinan técnicas como HPLC con MS, APCI-MS, FAB-MS y ESI-MS para la identificación de antocianinas. En las últimas dos décadas, se han desarrollado diversos métodos de ionización para muestras no volátiles y termodinámicamente inestables como las antocianinas. Estas técnicas evitan la volatilización y la subsecuente ionización así como suministrar energía a la muestra en estado sólido o líquido si no que la formación de los iones gaseosos se lleva a cabo directamente.

Con esta técnica es posible analizar moléculas que son susceptibles a sufrir fragmentaciones como las antocianinas y sus derivados acilados.

1.7.2 Resonancia magnética nuclear (NMR).

Hoy en día la resonancia magnética nuclear (NMR) se usa cada vez más para el análisis de los alimentos. Entre sus ventajas se encuentran la facilidad de la preparación de las muestras y los procedimientos para las mediciones, la estabilidad instrumental y la facilidad con lo que los espectros pueden ser interpretados.

La preparación de la muestra depende de la naturaleza de ésta (sólido o líquido). En algunos casos se requiere una previa extracción y en otros casos las muestras pueden ser utilizadas tal como son.

Se utilizan disolventes deuterados porque permiten la optimización de la resolución de los picos de NMR.

Las muestras sólidas son secadas por congelamiento y extraídas con solventes deuterados. Otras muestras, como aceites o café instantáneo, simplemente son disueltas a una concentración deseada con solventes deuterados. (Ignat *et al.*, 2011)

Las limitaciones que presenta este método son: el costo del equipo; el equipo para NMR es de 7 a 8 veces más caro que el necesario para el HPLC y que tiene una sensibilidad relativamente menor a la que se tiene en otras técnicas.

La resonancia magnética nuclear se utiliza principalmente para determinar la estructura de antocianinas aciladas en una y dos dimensiones. También es útil para identificar los productos de reacción de las antocianinas con otros compuestos como el ácido cinámico, radicales peróxido y flavonoides (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

1.8 FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LAS ANTOCIANINAS.

La función más importante de las antocianinas es la de impartir color a las frutas, hortalizas, flores, etc. en las que se encuentran presentes. Juegan un rol importante en la atracción de los animales para la polinización y el esparcimiento de semillas sin embargo también tienen otras funciones además de atraer

insectos; pueden actuar como antioxidantes, fitoalexinas o como agentes antimicrobianos.

El contenido de flavonoides, como las antocianinas, es un factor importante en la resistencia de las plantas a ataques de insectos. Por ejemplo, la cianidina 4-glucosido presente en las hojas de algodón ha demostrado ser protección contra el gusano del tabaco (Kong *et al.*, 2003).

1.8.1 Actividad antioxidante.

Los compuestos que son fáciles de oxidar son regularmente los mejores antioxidantes (moléculas que pueden donar un electrón o átomos de hidrogeno para reactivar radicales libres). Muchos estudios han demostrado que el contenido de antocianinas y su correspondiente actividad antioxidante, contribuye a la protección de las frutas y hortalizas contra enfermedades degenerativas (Heinonen *et al.*, 1998; Record *et al.*, 2001)

Se ha reportado (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009) que algunos extractos de plantas que tienen alto contenido de compuestos fenólicos actúan como inhibidores de la mutagénesis y la carcinogénesis.

Las antocianinas y antocianidinas han mostrado mayor actividad antioxidante que la vitamina C y E. Estos compuestos pueden capturar radicales libres donando átomos de hidrógeno; esta es la razón por la que tienen actividad anticarcinogénica.

También se ha reportado una relación lineal entre los valores de actividad antioxidante y el contenido de antocianinas de fresas, cerezas, y las moras rojas y negras. (Wang *et al.*, 2010)

HIPÓTESIS

Si las antocianinas presentes en las frutas y hortalizas son aciladas, su estabilidad ante la temperatura, la luz y el pH será mayor; convirtiendo a las fuentes comestibles que contengan éstas una potencial fuente de colorantes naturales para la industria alimentaria.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la estabilidad ante el pH, la temperatura y la luz, de las antocianinas obtenidas a partir del camote morado (*Ipomoea batatas*), el rábano (*Raphanus sativus*) y la campanilla roja (*Ipomoea purpurea*).

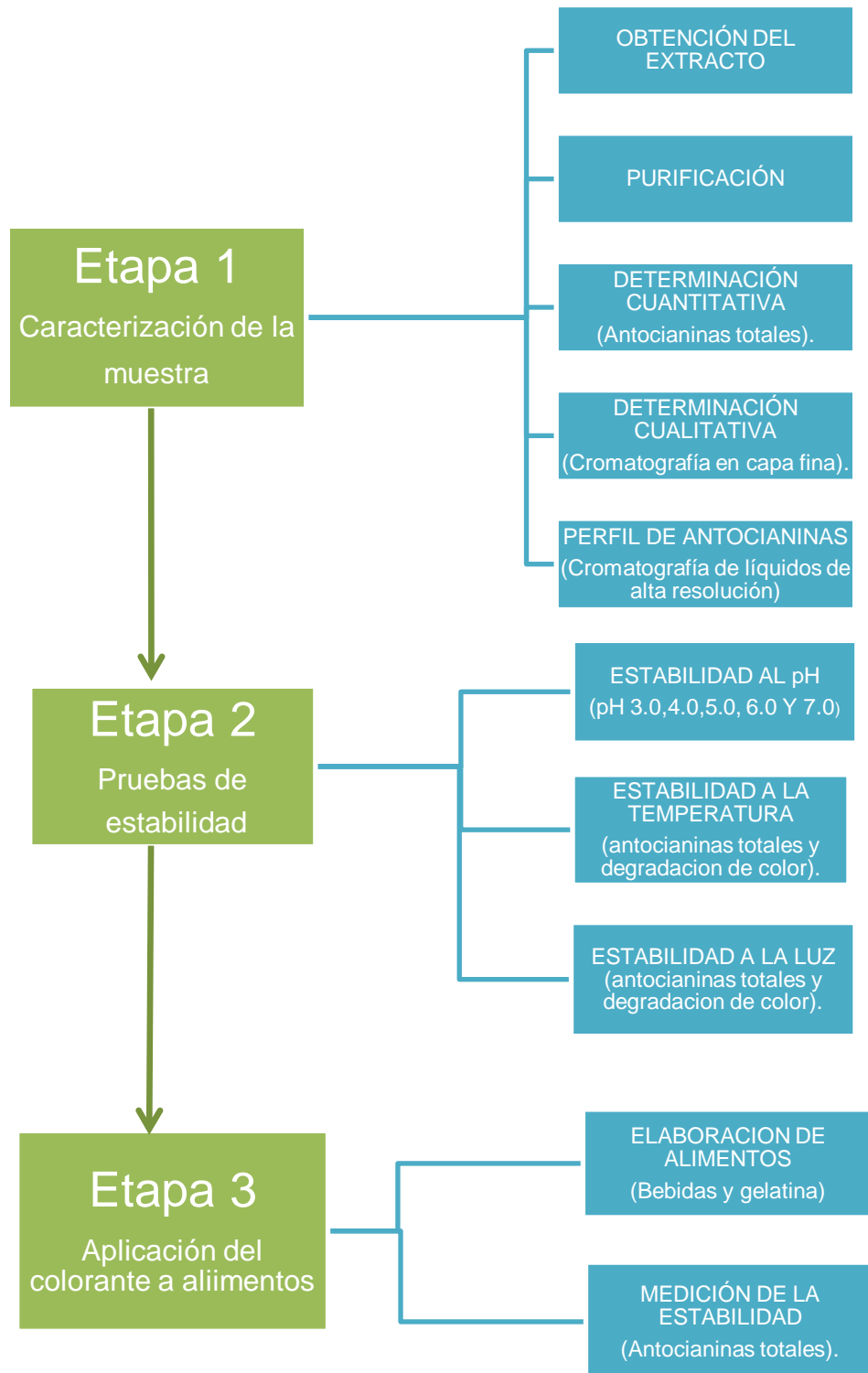
OBJETIVOS PARTICULARES.

- Obtener y purificar los extractos de antocianinas del camote, el rábano y la campanilla con las condiciones óptimas de: tiempo, cantidad de disolvente y acido.
- Cuantificar por el método de pH diferencial las antocianinas totales de las muestras.
- Desarrollar un sistema de cromatografía en capa fina para distinguir las antocianinas aciladas de las no aciladas y determinar un posible perfil de antocianinas mediante HPLC.
- Evaluar la estabilidad de las antocianinas a la temperatura y el pH mediante la determinación del orden de reacción de descomposición térmica, las constantes de rapidez, tiempo de vida media y la energía de activación de las antocianinas.
- Evaluar la estabilidad a la luz exponiendo los extractos a la luz solar durante un periodo de tiempo y evaluar la perdida de color.
- Aplicar las antocianinas extraídas como colorante en la elaboración de alimentos y evaluar su estabilidad.

2. METODOLOGÍA

2.1 ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL.

Para lograr los objetivos planteados se estableció el siguiente diagrama general:



La metodología consiste en 3 etapas: 1) Caracterización de la muestra, 2) Pruebas de estabilidad y 3) Aplicación del colorante a alimentos.

A continuación se detalla el procedimiento experimental de cada una de las etapas

Etapa 1. Caracterización de las muestras.

El objetivo de la primera etapa fue la obtención del extracto de antocianinas para la evaluación de aspectos cuantitativos como la determinación de antocianinas totales y aspectos cualitativos como su perfil de antocianinas mediante cromatografía de capa fina y cromatografía de líquidos de alta resolución.

Obtención del extracto.

El camote morado (pulpa y piel morada), la piel del rábano y campanilla roja se secaron por el método de secado en estufa durante 24 horas a una temperatura de 45°C. Para disminuir el tamaño de partícula, las muestras ya secas se molieron con un mortero y el polvo obtenido se guardó en bolsas de plástico a temperatura ambiente.

Para la extracción de las antocianinas, en un matraz Erlenmeyer se pesaron 10g del polvo y se sonicaron por 15 minutos con 100 mL de una mezcla de metanol, agua y ácido acético (60:40:1) en un sonicador branson 3510 con potencia de 100W, 42KHz a temperatura ambiente, se filtraron desechando la fase sólida y recuperando la fase acuosa en un matraz de bola. A la fase acuosa se le realizó la determinación de antocianinas totales siguiendo el método descrito por Giustin y Wrolstad en 2001.

El disolvente se evaporó en un rotavapor R-215 con baño de calentamiento a 50°C hasta obtener el extracto rico en antocianinas de cada muestra. Posteriormente se realizó la purificación del extracto para obtener las antocianinas aisladas para su estudio.

Purificación del extracto de antocianinas.

Los extractos se redisolviéron con lavados de 75 mL de acetato de etilo y 5 mL de agua destilada en un embudo de separación hasta que la fase orgánica no presentara coloración. Se desechó la fase orgánica y la fase acuosa se recuperó

en un matraz de bola en el que se llevó a sequedad en un rotavapor R-215 con baño de calentamiento a 50°C.

El sólido resultante se disolvió en agua y se transfirió a un matraz Erlenmeyer con 15g de resina (Amberlita XAD7HP). Se extrajeron por 24 horas a temperatura ambiente bajo agitación constante (280 rpm) evitando la exposición a la luz. Se filtraron al vacío desechando las aguas madres y recuperando la resina colorida para su desorción.

La desorción se llevó a cabo realizando lavados consecutivos en cada resina con una solución ácida (Metanol al 20% de ácido acético glacial) y filtrando al vacío hasta que la resina ya no presentara color. La solución colorida se recuperó en un matraz bola y se concentró con un rotavapor.

El extracto obtenido se guardó en refrigeración a 4°C evitando la exposición a la luz para su posterior utilización en todas las pruebas.

Determinación cuantitativa (antocianinas totales)

Para determinar la cantidad de antocianinas totales (mg de antocianinas/ g de muestra) presentes en cada una de las muestras, se realizó la determinación de antocianinas totales siguiendo el método de pH diferencial (Giustin y Wrolstad, 2001).

Las mediciones se realizaron a partir de las muestras extraídas con el disolvente. Se tomaron 200µL de la muestra y se mezclaron con 1800 µL de buffer de acetatos a pH 4.5, 0.4M y cloruros pH 1, 0.025M.

Con el espectrofotómetro se midió la absorbancia a 510 y 700 nm. El contenido de antocianinas totales se obtuvo mediante el método de pH diferencial.

Determinación cualitativa (Cromatografía en capa fina)

La cromatografía en capa fina se realizó con el objetivo de tener un primer perfil de antocianinas de las muestras.

Con el propósito de comparar las muestras de interés con otras muestras, en este experimento también se utilizaron extractos de noche buena, campanilla morada, berenjena, hojas de flamboyán, totomoxtle del maíz morado, zebrina y aguacate.

Los extractos fueron diluidos en 1 mL de metanol y agua (60:40) y posteriormente se aplicaron en las placas de gel de sílice y celulosa para ser eluidas en una mezcla de butanol/ácido acético/H₂O 4:1:5 (v/v)

Se utilizó el método BAW: utilizando como fases estacionarias gel de sílice en aluminio y celulosa en vidrio, para ambos soportes como fase móvil se utilizó una mezcla de butanol/ácido acético/H₂O 4:1:5 (v/v) sin revelador, únicamente identificando los compuestos de interés a través de la coloración de la placa una vez eluida (Froehlicher *et al.*, 2009).

Perfil de antocianinas en HPLC.

Se usó cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para la identificación del perfil de antocianinas. El extracto que se inyectó fue una cantidad conocida (de 5 a 10 mg) y se aforó a 1 mL con agua, en todos los caso se controló que el pH fuera alrededor de 2 para lograr la correcta separación de las señales en el HPLC.

El flujo fue de 1.2 mL/min, se usó un sistema de gradiente usando de fase móvil dos disolventes: disolvente A: ácido acético 10% y B: metanol:agua:ácido acético (50:40:10). El gradiente utilizado fue 0-5 min 90% A y 10% B; 5-10 min 100%B; 10-20 min 90% A y 10% B.

La identificación de las señales se llevó a cabo comparando los tiempos de retención obtenidos con los reportados en la literatura.

Etapa 2. Pruebas de estabilidad

En la segunda etapa se evaluó la estabilidad al pH, la temperatura y la luz de los extractos ricos en antocianinas del camote morado, el rábano y la campanilla obtenidos en la primera etapa.

Estabilidad a la temperatura y el pH.

Las pruebas de estabilidad a la temperatura se realizaron a 60, 70, 80 y 90°C y a valores de pH de 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 y 7.0

Alrededor de 50 mg del extracto se disolvieron en 25mL de buffer de citratos 0.2M a pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 y buffer de fosfatos 0.2M pH 7.0. Se colocaron en frascos bien tapados y se sometieron a baño María por 60 minutos.

Para medir la estabilidad ante la temperatura a diferentes valores de pH así como obtener la cinética de la degradación térmica de las antocianinas, se tomaron alícuotas cada 15 minutos y se realizó la medición de antocianinas totales, siguiendo el método pH diferencial, cuantificando el porcentaje de antocianinas remanente.

Degradación térmica del color

Para evaluar el efecto que tiene el cambio de temperatura y pH en la degradación del color, se colocaron en viales 5mL de las soluciones acuosas de los extractos de antocianinas antes y después de someterse al tratamiento térmico para posteriormente realizar la medición instrumental de color utilizando el método L*a*b o también conocido como el sistema CIELAB.

Estabilidad a la luz.

Para medir el efecto de la luz en la estabilidad de las antocianinas, se colocaron alrededor de 200mg del extracto en envases de vidrio transparente con tapa y se disolvieron en 100 mL de buffer de citratos 0.2 M a pH 3.0. Se expusieron a la luz solar por 9 días tomando alícuotas cada día y realizando la determinación de antocianinas totales siguiendo el método pH diferencial descrito por Giustin y Wrolstand en 2001.

Degradación del color por la exposición a la luz.

Para evaluar el efecto que tiene la luz en la degradación del color, se colocaron en viales 5 mL de las soluciones acuosas de los extractos de antocianinas todos los días durante los 9 días en el que se llevó a cabo la prueba de estabilidad a la luz. Posteriormente se realizó la medición instrumental de color utilizando el método L*a*b o también conocido como el sistema CIELAB el cual se describe posteriormente.

Etapa 3. Aplicación del colorante a alimentos.

El objetivo de esta etapa fue la aplicación de los extractos en la elaboración de bebidas y gelatinas para evaluar su estabilidad como colorantes durante 6 semanas.

La preparación de los alimentos se llevó a cabo de la siguiente manera:

Bebidas

Para la elaboración de las bebidas se preparó 1L de una base que contiene 86g de azúcar, 8mL de saborizante de fresa, 1.8g de ácido cítrico, 0.18g de benzoato de sodio y un pH de 3. Se pesaron 200mg del extracto y se disolvieron en 145 mL de la base en envases de vidrio transparentes.

Las bebidas se calentaron en un baño María hasta llegar a una temperatura de 89°C y se mantuvo por 2 minutos (condiciones para la pasteurización de un jugo), pasando este tiempo se les dio un choque térmico enfriándolas al chorro de agua. Se colocaron a temperatura ambiente por 6 semanas, tomando muestras cada semana. Se realizó la determinación de antocianinas totales mediante el método de pH diferencial para evaluar la estabilidad del colorante en las bebidas.

Gelatina

Al igual que para la elaboración de las bebidas, se prepararon 500mL de una base que contiene 60g de azúcar, 10.65g de grenetina, 4mL de saborizante de fresa, 0.7g de ácido cítrico, 30 mg de benzoato de sodio, 30 mg de sorbato de potasio y pH de 4.

Para la elaboración de la base se disolvieron todos los ingredientes, excepto la grenetina, con 450 mL de agua y se calentó hasta la ebullición. En un recipiente aparte se hidrato la grenetina con 50mL de agua fría y se incorporó a la mezcla agitando para evitar la formación de grumos.

Se pesaron 100mg de los extractos y se disolvieron en 50 mL de la base, la mezcla se transfirió a envases de gelatina, se taparon con papel aluminio y se dejaron enfriar a temperatura ambiente por una hora. Posteriormente se guardaron en refrigeración a 4°C por 6 semanas, tomando muestras cada semana.

Para realizar la determinación de antocianinas totales, las antocianinas de las gelatinas fueron extraídas de la siguiente manera:

En un matraz Erlenmeyer se pesó 1g de gelatina, se le agregaron 2 mL de disolvente ácido (MetOH:H₂O:HCl 60:40:1 v/v) y se extrajeron las antocianinas sonicando por 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la determinación de antocianinas totales siguiendo el método de pH diferencial.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 EQUIPOS Y MUESTRAS

Equipos

- Rotavapor R-215, con baño de calentamiento B-491, controlador de vacío V-850, bomba de vacío V-700 marca Büchi.
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC: autoinyector Waters 2707, bomba Waters 152, detector UV Waters 2478 y Desgasificador, con software Empower.
- Columna Hypersil GOLD 250 x 4.6mm 5µm. Marca Thermo scientific.
- Espectrofotómetro GBC-CINTRAL.
- Balanza analítica OHAUS AP1105.
- Sonicador branson 3510 potencia: 100W, 42KHz.
- Agitadora Thermo scientific.
- Colorímetro Minolta CM-3600d.
- Parrilla eléctrica

Muestras

- Cáscara de rábano. *Raphanus sativus*
- Camote morado. *Ipomoea batatas*
- Campanilla roja. *Ipomoea purpurea*

Las muestras fueron obtenidas de lugares diferentes pero cada muestra por separado se homogenizó para asegurar la utilización de la misma muestra durante todas las pruebas.

Para la cromatografía en capa fina se utilizaron extractos de:

- Noche buena. *Euphorbia pulcherrima*
- Campanilla morada. *Ipomoea purpurea*
- Berenjena. *Solanum melongena*
- Hojas de Flamboyán. *Delonix regia*
- Totomoxtle maíz morado. *Zea mays*
- Caña de maíz morado. *Zea mays*
- Zebrina. *Tradescantia Spathace.*
- Aguacate. *Persea americana*

3.2 DATOS DE LAS MUESTRAS.

Rábano

El rábano utilizado en el proyecto se compró en la Mega Comercial Mexicana sucursal Coapa.

La muestra se lavó y se le quitó la cáscara, la cual se secó a 45 °C, se molió y se homogeneizó para utilizar la misma muestra durante todo el proyecto.

Camote morado

El camote morado que se utilizó en este proyecto se obtuvo de la central de abasto de la ciudad de México.

Las muestras se lavaron, se secaron y se guardaron en congelación a -80°C para su posterior liofilización. Después se molieron y se homogeneizaron para utilizar la misma muestra durante todo el proyecto.

Campanilla

Las flores de campanilla utilizadas en este proyecto se obtuvieron de un parque ubicado en Xochimilco. Todas las flores se cortaron de la misma planta, se secaron a 45°C, se molieron y se homogeneizaron para utilizar la misma muestra durante todo el proyecto.

3.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS

3.3.1 Determinación de antocianinas totales

Debido a que el pH es uno de los principales factores que afecta la estabilidad del color de las antocianinas, la concentración de antocianinas se determinó por absorbancia usando el método de pH-diferencial, propuesto por Giustin y Wrolstand en 2001.

Este método se basa en que los espectros de UV-visible de las antocianinas varía de acuerdo al pH del medio, estas moléculas dan dos bandas de absorción en la región UV (260-280) y la región visible (490-550), el método permite la estimación del contenido de antocianinas totales, incluso en la presencia de pigmentos polimerizados y otras interferencias.

Las mediciones se hicieron a partir de las muestras extraídas con el disolvente. Se tomaron 200µL de la muestra y se mezclaron con 1.800 µL de buffer de acetatos a pH 4.5, 0.4M y cloruros pH 1, 0.025M.

Con el espectrofotómetro se midió la absorbancia a 510 y 700 nm. El contenido de antocianinas totales se expresa como mg/L de cianidina 3-glucósido. Para el cálculo se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$A_T = (A_{\text{max. vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{\text{max vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}$$

$$\text{Ant}_T = \frac{AT \times PM \times FD \times 100}{\epsilon \times 1}$$

Dónde:

PM: cianidina-3-glucósido: 449.2 g/mol.

FD: factor de dilución. (10)

ε: Absortividad molar de la cianidina-3-glucósido: 26900L/cm mg.

La concentración final de antocianinas en mg/g de muestra se calcula en base al volumen de extracto y peso de la muestra.

6.3.2 Cromatografía en capa fina.

La cromatografía en capa fina es un método rápido y sencillo de separación e identificación.

Se utilizó el método BAW, utilizando como fases estacionarias gel de sílice en aluminio y celulosa en vidrio, para ambos soportes como fase móvil se utilizó una mezcla de butanol/ácido acético/H₂O 4:1:5 (v/v) sin revelador, únicamente identificando los compuestos de interés a través de la coloración de la placa una vez eluida.

6.3.3. Determinación de la cinética de degradación térmica.

Los modelos cinéticos son utilizados para determinar la influencia del procesamiento en los parámetros críticos de calidad de los alimentos. El conocimiento de la cinética de la degradación es muy importante para predecir la

pérdida de calidad de los alimentos durante el almacenamiento y los procesos térmicos a los que son sometidos.

Estudios anteriores (Hillmann et al., 2011; Kirca et al., 2007; Wang & Xu, 2007) demuestran que la degradación térmica de las antocianinas sigue el modelo cinético de una reacción de primer orden. Los parámetros clave de la degradación térmica, tiempo de vida media y energía de activación, son calculados utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\ln (C_t/C_0) = - k \times t$$

$$t_{1/2} = - \ln 0.5 \times k^{-1}$$

$$\ln k = \ln k_0 - Ea/RT$$

Donde C_0 es la concentración inicial de antocianinas y C_t la concentración de antocianinas después del tiempo t (min). $t_{1/2}$ es el tiempo de vida media, k la constante de rapidez (min^{-1}), k_0 es el factor frecuencia (min^{-1}), Ea la energía de activación (kJ/mol), R es la constante universal de los gases (8.314 J/molK) y T es la temperatura absoluta (Kelvin).

6.3.4 Medición instrumental del color.

Los instrumentos de medición del color buscan simular la manera en la cual los ojos humanos captan el color de un objeto, para proporcionar una medida cuantitativa reproducible.

Para la medición de color de las muestras se utilizó el método L^*a^*b o también conocido como el sistema CIELAB.

el instrumento que se utiliza para llevar a cabo la evaluación del color en los alimentos, es el Espectrofotómetro Minolta CM-3600d, el cual mide los factores de reflectancia y de transmitancia espectrales, teniendo como objetivo, comparar a cada longitud de onda, el flujo radiante reflejado o transmitido por el objeto, con el de un patrón en caso de que exista. (Gilabert, 2002)

Antes de cualquier evaluación, el instrumento es calibrado con un negro y un blanco; dentro de la calibración se indica al equipo cuales con las condiciones de trabajo (Tabla 3).

Tabla 3. Condiciones de trabajo sistema CIELAB.

Parámetro	Condición y/o valor
No. de disparos o flashes	1
Estándar	Nulo
Energía UV	Incluida
Componente especular (SC)	Excluido
Lente o área de visión	Grande (Large: 25.4 mm) Pequeño (Small: 4 mm)
Iluminante	D65 (Luz de día, natural 6500K)
Detector	10°
Sistema de reporte de color	CIE L a*b*, Hunter Lab

El atributo L describe el componente claridad o luminosidad de un color, en base a las tonalidades blanco (100) hasta negro (0). La coordenada “a” da un valor de las tonalidades rojo (+) hasta verde (-), mientras que la coordenada “b” indica tonalidades de amarillo (+) hasta azul (-).

La diferencia de color (ΔE) entre las muestras se calculó siguiendo la siguiente formula:

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

6.3.5 Análisis estadístico.

Las determinaciones de estabilidad a la temperatura, el pH y la luz se realizaron por triplicado; las determinaciones de antocianinas totales de la primera parte y la aplicación del colorante a los alimentos se realizaron por duplicado.

Para el análisis de los datos se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de todas las determinaciones con un nivel de confianza del 95% y cuando existe diferencia significativa entre las muestras se aplicó la prueba del rango múltiple de Duncan.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa 1 Caracterización de la muestra.

En esta etapa se llevó a cabo la caracterización de las muestras; se obtuvo el extracto rico en antocianinas, se purificó y se determinó la cantidad de antocianinas totales. Además se obtuvo su perfil de antocianinas mediante cromatografía en capa fina y cromatografía de líquidos de alta resolución.

A continuación se muestran los resultados obtenidos:

4.1 Antocianinas totales.

Las muestras se secaron, se molieron y se extrajeron las antocianinas mediante una extracción simple con disolventes (metanol, agua y ácido acético (60:40:1)). En la fracción acuosa se cuantificaron las antocianinas totales de las muestras, por medio del método pH diferencial descrito por Giustin y Wrolstand en 2001, para determinar la cantidad de antocianinas presentes en la muestra, ya que además de que contengan antocianinas aciladas, es importante que contengan cantidades importantes para obtener un mejor rendimiento.

Además de determinar las antocianinas totales del camote, el rábano y la campanilla roja; se determinaron las antocianinas totales de la zebrina, papa morada, berenjena, noche buena y campanilla morada para comparar la cantidad obtenida en las muestras de interés con la cantidad que tienen otras muestras.

En la tabla 4 podemos observar que las muestras de interés tienen un mayor contenido de antocianinas comparadas con las otras muestras. El rábano es la muestra con mayor contenido de antocianinas mientras que el contenido de antocianinas en la campanilla y el camote es muy parecido.

Tabla 4. Antocianinas totales expresadas en mg de cianidina/g muestra.

Muestra	Antocianinas totales (mg/g)
Campanilla roja	3.39 ± 0.13
Rábano	9.94 ± 0.01
Camote morado	3.9 ± 0.20
Zebrina	1.24 ± 0.05
Papa	1.98 ± 0.17
Berenjena	1.87 ± 0.03
Noche buena	3.3 ± 0.42
Campanilla morada	3.4 ± 0.12

7.2 Cromatografía en Capa Fina (CCF).

Con el propósito de observar un primer perfil de antocianinas de las diferentes fuentes vegetales, se montaron dos sistemas de Cromatografía en Capa Fina identificando los compuestos por la coloración impartida en la cromatoplaque una vez eluida.

Para tener un perfil más amplio y comparar con diferentes muestras, además de los extractos de rábano, camote y campanilla roja, en esta parte se utilizaron extractos de noche buena, campanilla morada, berenjena, hojas de Flamboyán, totomoxtle y caña de maíz morado, zebrina y aguacate.

De igual manera que para obtener los extractos de rábano camote y campanilla, para la obtención de estos extractos, las muestras se secaron en estufa a 45°C y se molieron con un mortero.

Se colocaron 5 g de la muestra en un matraz Erlenmeyer y se sonicaron por 15 minutos con 50 mL de una mezcla de metanol, agua y ácido acético (60:40:1) en un sonicador Branson 3510 con potencia de 100W, 42KHz a temperatura ambiente, se filtraron desechando la fase sólida y recuperando la fase acuosa en un matraz de bola. El disolvente se evaporó en un rotavapor R-215 con baño de calentamiento a 50°C hasta obtener el extracto rico en antocianinas de cada muestra. Posteriormente se realizó la purificación del extracto para obtener las antocianinas aisladas para su estudio.

Los extractos fueron diluidos en 1 mL de metanol y agua (60:40) y posteriormente se aplicaron en las placas de gel de sílice y celulosa para ser eluidas en una mezcla de butanol/ácido acético/H₂O 4:1:5 (v/v). Como estándar se utilizó una antocianina no acilada, la cianidina-3-glucósido extraída y purificada del aguacate, y una acilada; la delfinina-3-(p-cumarilrutinosido)-5-glucosido (nasunina) de la berenjena.

En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos para los extractos en gel de sílice.

El extracto número uno fue el de referencia, la cianidina-3-glucosido del aguacate (circulada en rojo), en el flamboyán (extracto número 12) se observó una mancha muy similar por lo que se cree que es también cianidina-3-glucósido. Se esperaba que las antocianinas aciladas aparecieran arriba de la cianidina-3-glucósido ya que se sabe que en el HPLC el tiempo de retención de las antocianinas aciladas es mayor que el de las no aciladas.

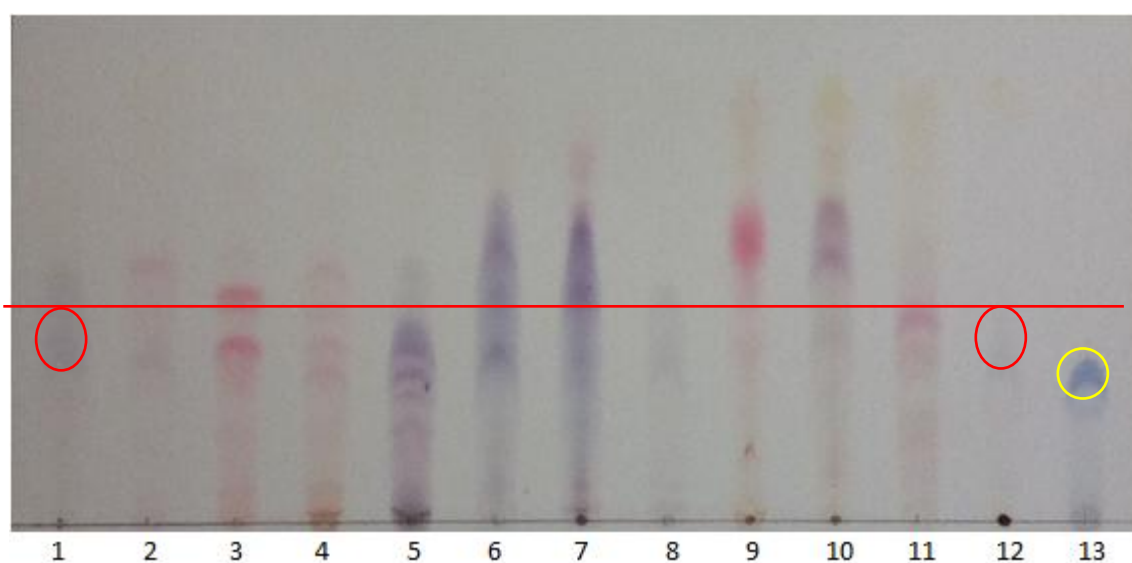


Figura 7 Cromatoplaaca 1. Cromatografía en Capa Fina gel de sílice. 1 aguacate, 2 camote morado, 3 rábano, 4 campanita roja, 5 campanita morada, 6 totomoxtle seco, 7 totomoxtle fresco, 8 caña, 9 papa roja, 10 noche buena, 11 zebrina, 12 flamboyán, 13 berenjena.

Se dibujó una línea esperando que las antocianinas aciladas aparecieran arriba de ésta, sin embargo, se observó que la antocianina acilada de referencia (nasunina de la berenjena, circulada en amarillo) aparece debajo de esta línea. Noda, *et al.*, 1999 reportan que la estructura de la nasunina es una estructura

muy compleja, como se muestra en la figura 8, debido a esto la mancha en la cromatoplaqa está más abajo que la cianidina-3-glucosido ya que es más difícil separarla.

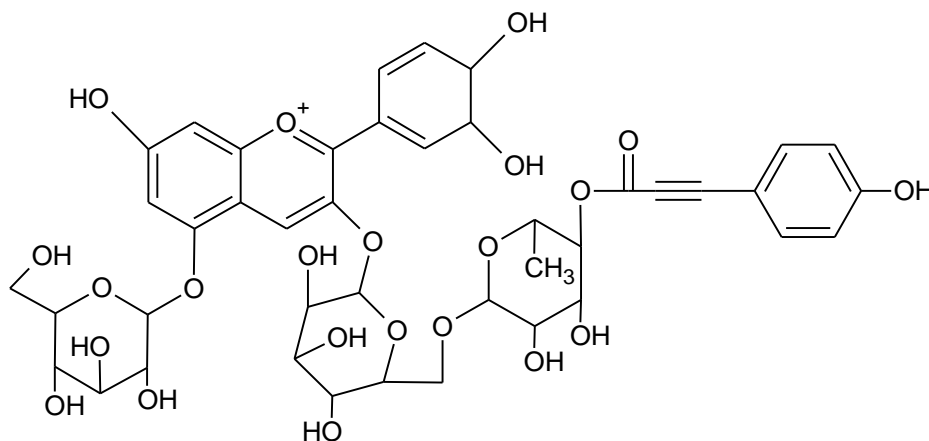


Figura 8 Estructura de la nasunina, delfinina-3-(p-cumarilrutinosido)-5-glucosido

Para la campanilla roja se reportan mayoritariamente antocianinas aciladas (Norio, *et al*, 1995) y en la cromatoplaqa las manchas también aparecen abajo. Wang S., *et al.*, 2010, reportan 3 antocianinas aciladas derivadas de la pelargordina para el rábano; en los resultados obtenidos se observan dos manchas una arriba y otra debajo de la cianidina-3-glucosido.

En general en este sistema no se obtuvieron los resultados esperados, algunas antocianinas aciladas aparecieron antes de la cianidina-3-glucosido y otras después. Esto puede ser debido a la complejidad de las estructuras y la composición de cada una de las antocianinas de las diferentes muestras.

El otro sistema que se manejó fue el de celulosa en vidrio, los extractos se trataron igual que en sílice y el eluyente fue el mismo. En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos para este sistema.

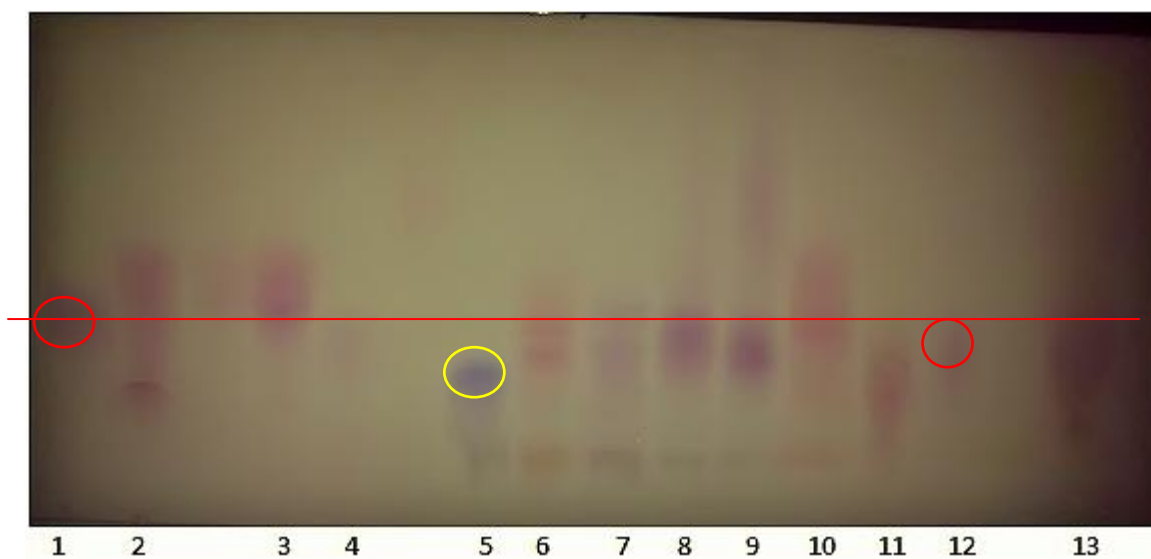


Figura 9 Cromatoplaaca 2. Cromatografía en Capa Fina celulosa. 1 aguacate, 2 camote morado, 3 caña, 4 papa, 5 berenjena, 6 campanita roja, 7 campanita morada, 8 totomoxtle fresco, 9 totomoxtle seco, 10 rábano, 11 zebrina, 12 flamboyán, 13 noche buena.

En esta cromatoplaaca también se trazó una línea a partir de la cianidina-3-glucósido del aguacate. Se puede observar que en la cromatoplaaca de celulosa hay un menor número de manchas por encima de la línea que en la de sílice. En la cromatoplaaca de sílice, las manchas de la campanilla morada y roja aparecen por encima y por debajo de la línea trazada mientras que en la de celulosa aparecen debajo de la línea y en el caso del rábano, en el sílice aparece una mancha debajo de la línea y una arriba, mientras que en celulosa aparece por encima de la línea.

En este sistema también se observa que las antocianinas no siguen un comportamiento con el cual se pueda distinguir entre las antocianinas aciladas y las no aciladas.

La cromatografía en capa fina da una idea del perfil de antocianinas pero no es un método adecuado para la identificación de las antocianinas aciladas, por lo que se continuó con la siguiente parte del proyecto: la identificación del perfil de antocianinas en HPLC.

7.3 Determinación del perfil de antocianinas en HPLC.

Para este proyecto es importante la identificación del perfil de antocianinas ya que el objetivo principal es la obtención de antocianinas aciladas.

Para la identificación parcial del perfil de antocianinas se utilizó cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) ya que es el método más usado para la identificación de antocianinas. La muestra que se inyectó se obtuvo a partir del extracto de la muestra disuelta en 1 mL de agua.

Para la identificación de las señales de las antocianinas se utilizó la curva patrón de cianidina-3-glucósido obtenida a partir de un extracto de aguacate (Anexo 10.1).

De acuerdo a la literatura las antocianinas aciladas tienen mayor tiempo de retención que las no aciladas. Se tomó como referencia el tiempo de retención de la cianidina-3-glucósido, que de acuerdo a la curva patrón está en un intervalo de 5.66 a 5.81 min, tomando como posibles antocianinas aciladas todas las señales con tiempos de retención mayores a ésta.

Los resultados fueron los siguientes:

CAMOTE MORADO

Como se muestra en la tabla 5, para la muestra de camote morado se encontraron 6 posibles antocianinas aciladas.

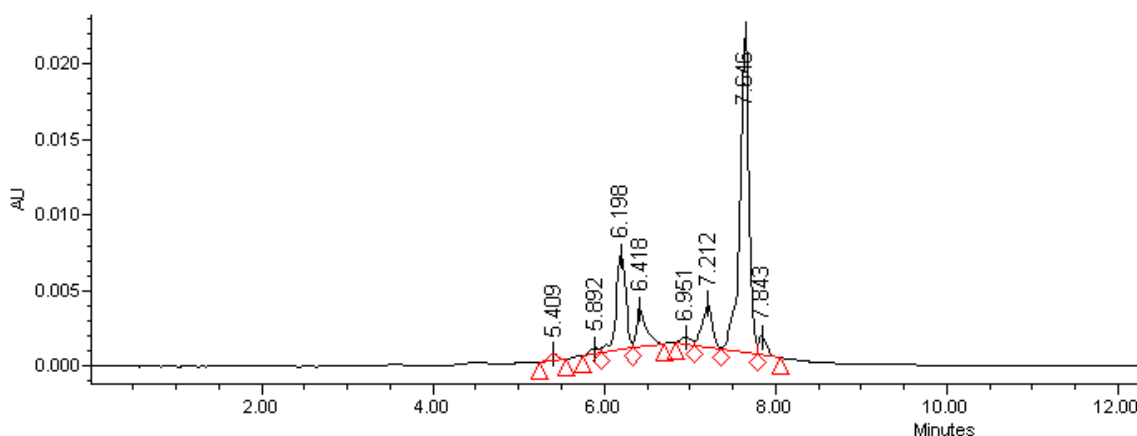


Figura 10. Cromatograma del perfil de antocianinas del camote morado.

Tabla 5. Tiempo de retención y % área de las antocianinas.

	Tiempo de retención (min)	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$)	%Área
1	5.409	3354	1.26
2	5.892	2854	1.07
3	6.198*	48510	18.19
4	6.418*	20279	7.60
5	6.951*	3655	1.37
6	7.212*	23433	8.79
7	7.646*	156407	58.64
8	7.843*	8234	3.09

*Posibles antocianinas aciladas

De acuerdo a Jie, *et al*, 2013, las antocianinas principales del camote son la cianidina y la peonidina glicosiladas con glucosa y sofrorosa. Además casi todas las antocianinas tienen residuos de azúcares acilados con ácido p-hidroxibenzoico, ácido ferúlico o ácido cafeico.

También reportan 2 antocianinas mayoritas: la peonidina-3-cafeoil sofrorosido-5-glucosido y la peonidina-3-cafeoil-p-hidroxibenzoil sofrorosido-5-glucosido, ambas aciladas

CAMPANILLA ROJA

Como se muestra en la tabla 6, en la campanilla roja se encontraron 8 posibles antocianinas aciladas.

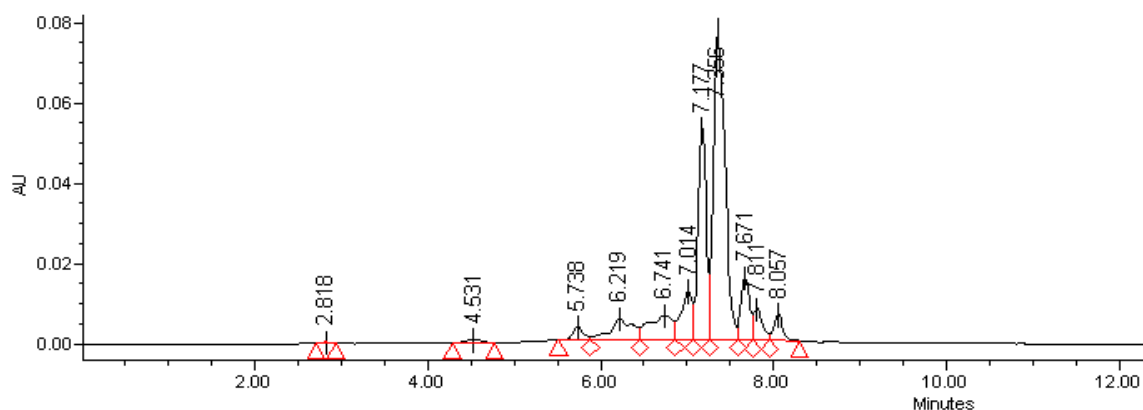


Figura 11. Cromatograma del perfil de antocianinas de la campanita roja.

Tabla 6. Tiempo de retención y % área de las antocianinas.

	Tiempo de retención (min)	Área ($\mu V \cdot seg$)	%Área
1	2.818	1593	0.10
2	4.531	11434	0.70
3	5.738	26972	1.64
4	6.219*	95036	5.79
5	6.741*	119673	7.29
6	7.014*	104352	6.35
7	7.177*	355908	21.67
8	7.356*	715706	43.58
9	7.671*	109579	6.67
10	7.811*	55735	3.39
11	8.057*	46123	2.81

*Posibles antocianinas aciladas

De acuerdo con Norio S. *et al*, 1998 las antocianinas presentes en la campanilla roja están formadas principalmente por la Cianidina 3- soforosido y la Pelargonidina 3-soforosido-5-glucosido aciladas con ácido cafeico y/o ácido glucosilcafeico.

Las antocianinas que se encuentran en mayor proporción son aciladas y son la Pelargonidina 3-[2-(glucosilcafeoilglucosil)-6 (cafeilglucosilcafeil)-glucosido]-5-[glucosido] y la Cianidina 3-[2-(glucosilcafeoilglucosilcafeoilglucosil)-glucosido].

RÁBANO

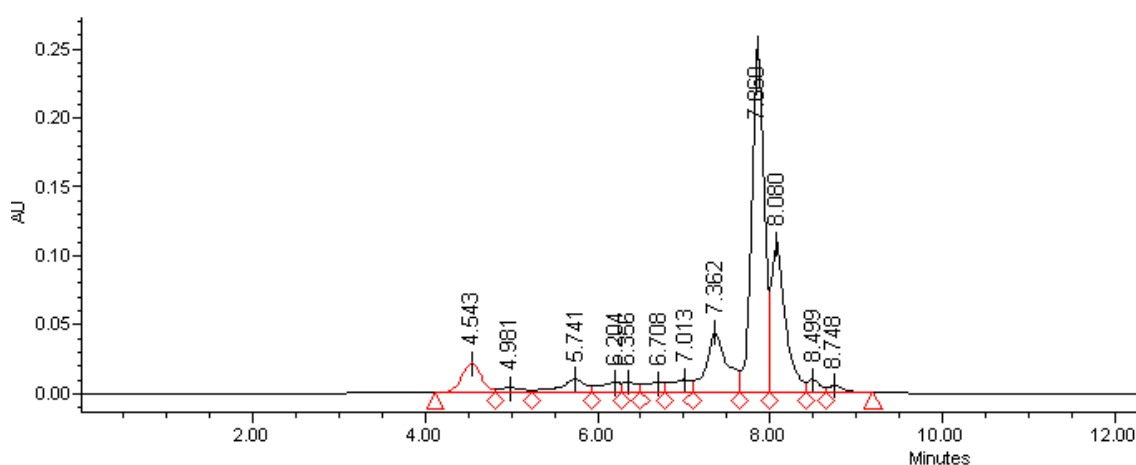


Figura 12. Cromatograma del perfil de antocianinas del rábano.

Tabla 7. Tiempo de retención y % área de las antocianinas.

	Tiempo de retención (min)	Área ($\mu V \cdot \text{seg}$)	%Área
1	4.543	335322	5.84
2	4.981	67452	1.17
3	5.741	202407	3.52
4	6.204*	125374	2.18
5	6.356*	88586	1.54
6	6.708*	111856	1.95
7	7.013*	154529	2.69
8	7.362*	738056	12.84
9	7.860*	2533720	44.10
10	8.080*	1231458	21.43
11	8.499*	95671	1.67
12	8.748*	61446	1.07

*Posibles antocianinas aciladas

Como se muestra en la tabla 7, en la muestra de rábano se encontraron 9 posibles antocianinas aciladas.

Jing et al., (2012) reportan que las antocianinas presentes en el rábano son derivadas de la pelargonidina-3-soforosido-5 glucósido aciladas con ácidos hidroxycinámicos (ácido p-cumárico, cafeico y/o ferúlico). Las antocianinas mayoritarias son la pelargonidina 3-O-[6-O-(E)-feruloil-2-O- β -D-glucopiranosil]- β -D-glucopiranosido]-5-O-(β -D-glucopiranosido) y la Pelargonidina 3-O-[6-O-(E)-feruloil-2-O-(6-(E)-cafeoil- β -D-glucopiranosil)- β -D-glucopiranosido]-5-O-(β -D-glucopiranosido).

Se puede observar que el rábano fue la muestra en la cual se obtuvieron un mayor número de señales por lo que de las tres es la que contiene más antocianinas aciladas, mientras que en el camote morado se encontraron un menor número. De acuerdo a lo descrito en la literatura, las tres muestras tienen como base diferentes antocianinas: las antocianinas del camote morado son derivadas de la cianidina y la peonidina, las de la campanilla de la cianidina y la pelargonidina, mientras que las antocianinas del rábano tienen como base únicamente la pelargonidina.

Etapa 2. Pruebas de estabilidad

Debido a que uno de los mayores problemas de las antocianinas es su baja estabilidad en las condiciones de proceso, formulación y conservación a los que se someten los alimentos en esta etapa se evaluó el efecto de la temperatura, el pH y la luz en la degradación de las antocianinas y del color.

Además se realizó la cinética de degradación térmica y se obtuvieron las constantes de rapidez, el tiempo de vida media y la energía de activación.

Las primeras pruebas consistieron en la evaluación de la estabilidad de las antocianinas a diferentes valores de temperatura y pH así como del cálculo de la cinética de degradación térmica.

7.4 Estabilidad a la temperatura y el pH.

Las pruebas de estabilidad a la temperatura se realizaron a 60, 70, 80 y 90°C y a pH de 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 y 7.0. En frascos de vidrio se pesó alrededor de 50 mg de extracto, se disolvieron en 25 mL de cada buffer y se sometieron a calentamiento en baño María por 60 minutos. Se midieron antocianinas totales antes y después de someterse al tratamiento para cuantificar el porcentaje remanente de antocianinas.

Las tablas 8, 9 y 10 muestran el porcentaje remanente de antocianinas en el camote, la campanilla roja y el rábano después de ser sometidas a los diferentes tratamientos.

Se puede observar que al aumentar la temperatura y el pH el porcentaje de antocianinas remanente disminuye.

Tabla 8. Porcentaje antocianinas remanentes a diferentes temperaturas del camote en soluciones acuosas a varios valores de pH.

pH	Temperatura			
	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C
3	78.158 ^a	70.495 ^a	63.423 ^{ac}	52.191 ^{ac}
4	76.664 ^{ab}	59.119 ^{ab}	54.099 ^{abd}	53.757 ^{abd}
5	67.718 ^b	65.497 ^b	52.817 ^{be}	51.805 ^{be}
6	61.528	54.870	42.536 ^f	34.522 ^f
7	59.917	46.391	29.002 ^g	30.153 ^g

^a muestras entre las que no hay diferencia mínima significativa ($\alpha=5\%$)

Tabla 9. Porcentaje de antocianinas remanentes a diferentes valores de temperatura de la campanilla en soluciones acuosas a varios valores de pH.

<i>pH</i>	<i>Temperatura</i>			
	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C
3	72.478 ^{abc}	69.606 ^{def}	58.901 ^{abc}	51.540 ^{def}
4	68.220 ^B	68.375 ^h	55.803 ^B	49.321 ^h
5	66.448 ^a	66.054 ^d	50.058 ^a	48.153 ^d
6	65.966 ^b	65.361 ^e	46.506 ^b	42.125 ^e
7	64.522 ^c	63.065 ^f	39.772 ^c	36.307 ^f

^a muestras entre las que hay diferencia mínima significativa ($\alpha=5\%$)

Tabla 10. Porcentaje de antocianinas remanentes a diferentes valores de temperatura del rábano en soluciones acuosas a varios valores de pH.

<i>pH</i>	<i>Temperatura</i>			
	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C
3	76.685 ^a	77.370 ^a	71.881 ^e	79.024 ⁱ
4	74.109 ^{ab}	77.482 ^{ab}	66.138 ^{ef}	71.330 ^{ij}
5	73.607 ^{bc}	73.525 ^{bc}	62.416 ^{fg}	65.580 ^{jk}
6	71.286 ^{cd}	76.186 ^{cd}	63.862 ^{gh}	66.823 ^{kl}
7	72.947 ^d	72.681 ^d	57.830 ^h	51.058 ^l

^a muestras entre las que no hay diferencia mínima significativa ($\alpha=5\%$)

La estabilidad de las antocianinas disminuye conforme aumenta la temperatura. Diversos autores han estudiado la influencia de la temperatura en la estabilidad de las antocianinas provenientes de diferentes fuentes, comprobando que el aumento de la temperatura tiene un efecto perjudicial en el contenido de antocianinas (Ikeda et al., 2009; Jiménez et al., 2010; Pu Jing et al., 2012; Fan G. et al., 2008).

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% de los datos obtenidos para las tres muestras. En la tabla 11 se reportan los valores de F calculada y los valores críticos de F.

Tabla 11. Valores de F obtenidos a partir del análisis de varianza ANOVA

<i>Muestra</i>	<i>F calculada</i>		<i>Valor crítico para F</i>	
	pH	Temperatura	pH	Temperatura
Camote	24.839	36.913	3.259	3.490
Rábano	4.805	7.896	3.259	3.490
Campanilla	12.289	86.258	3.259	3.490

Como se puede observar, para todas las muestras, los valores de F calculada son mayores a los valores críticos de F por lo tanto hay diferencia significativa en el porcentaje de antocianinas totales remanentes al variar los valores de pH y temperatura.

Con la prueba del rango múltiple Duncan se determinó entre que condiciones de pH y temperatura hay diferencia significativas y entre cuáles no, los resultados se muestran en las tablas 8, 9 y 10. Con el análisis se observa que en general, no hay diferencia significativa en los valores obtenidos entre valores cercanos de temperatura y pH.

Las antocianinas pueden encontrarse en diferentes formas químicas dependiendo del pH de la solución y por lo tanto presentan diferentes colores en diferentes valores de pH (Castañeda-Ovando. *et al.*, 2009). En las figuras 13, 14 y 15 se muestran los colores que presentan las muestras en los diferentes valores de pH.



Figura 13. Extracto de rábano en soluciones acuosas a pH 3, 4, 5, 6 y 7.

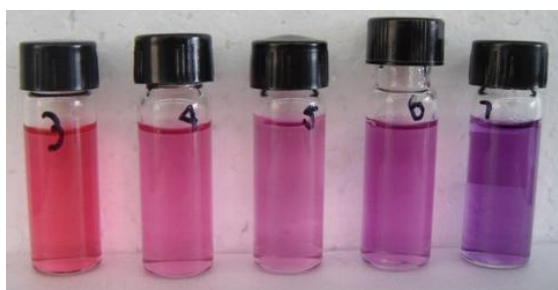


Figura 14. Extracto de camote en soluciones acuosas a pH 3, 4, 5, 6 y 7.



Figura 15. Extracto de la campanilla roja en soluciones acuosas a pH 3, 4, 5, 6 y 7.

Las antocianinas del rábano tienen como base la pelargonidina, las antocianinas del camote la peonidina y las antocianinas de la campanilla roja la cianidina y la pelargonidina; es debido a esto y a los sustituyentes que tenga cada antocianina, que se observan diferentes colores en los mismos valores de pH.

En condiciones ácidas (pH entre 1 y 4) las especies que predominan son el ion flavilio y la base quinoidal que son moléculas coloridas, al aumentar el pH (5 y 6) las especies que predominan son incoloras y a valores de pH mayores a 7 las antocianinas son degradadas; debido a esto las antocianinas son más estables en medios ácidos con valores bajos de pH que en medios alcalinos con valores altos de pH (Cavalcanti. *et.al*, 2011).

Con el propósito de comparar la estabilidad de las tres muestras se realizaron graficas de pH contra el porcentaje de antocianinas remanentes a las diferentes temperaturas, los resultados se muestran en la figura 20.

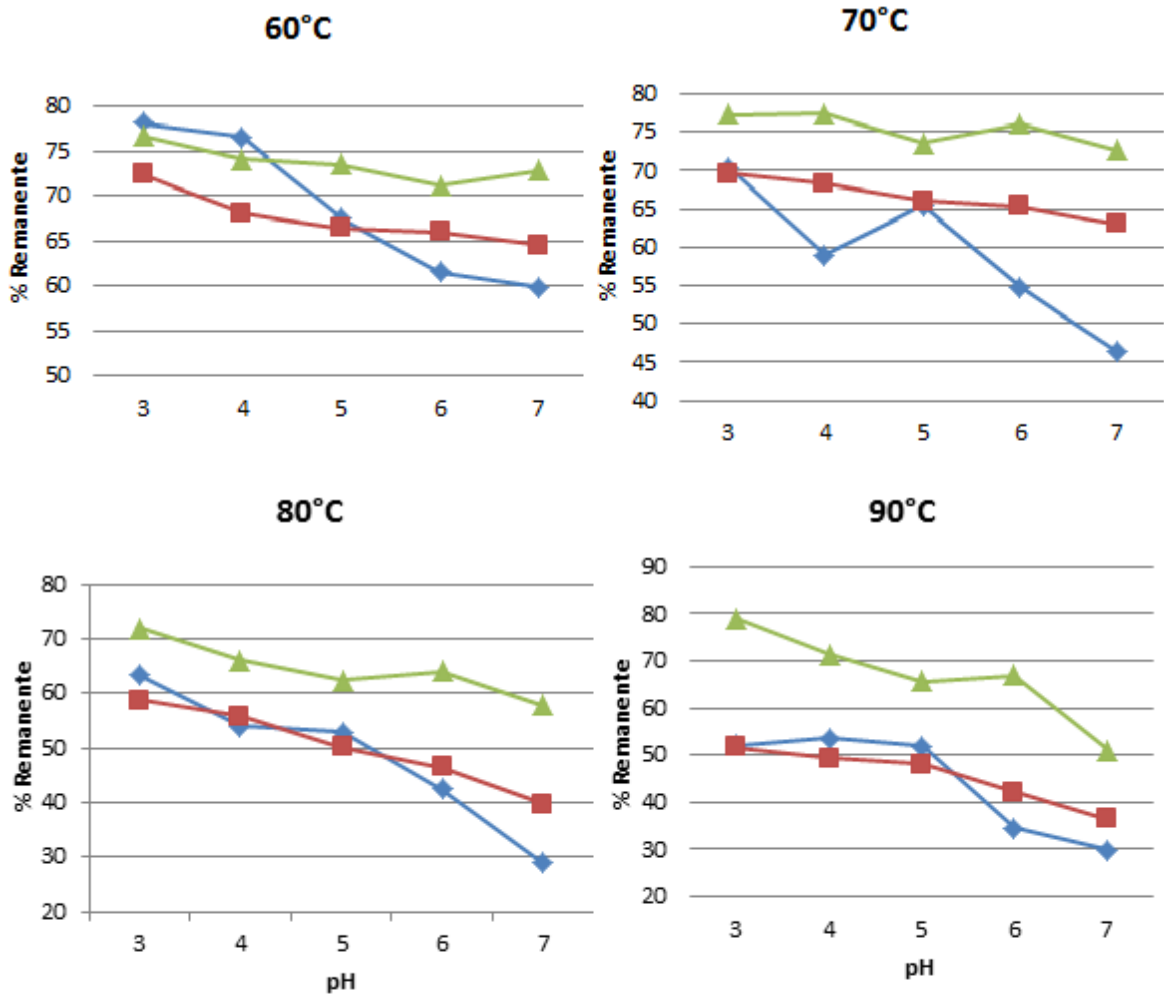


Figura 20. Gráficas comparativas del pH contra el porcentaje de antocianinas aciladas remanentes del camote ◆, el rábano ▲ y la campanilla roja ■ a temperaturas de 60, 70, 80 y 90°C.

Se puede observar que las antocianinas del camote son más sensibles a los cambios de pH ya que conforme se aumenta el pH el porcentaje de antocianinas remanente decae drásticamente mientras que el porcentaje de antocianinas del rábano y la campanilla también disminuye al aumentar al pH pero en menor proporción.

También se observa que las antocianinas del rábano son más estables a los cambios de pH y temperatura que las antocianinas del camote y la campanilla porque la cantidad de antocianinas remanentes obtenidas para este está por encima de las obtenidas para el camote y la campanilla en todos los casos.

De acuerdo a Castañeda-Ovando. *et al.*, 2009, la pelargonidina es la antocianina más estable. El rábano tiene como base de todas sus antocianinas la pelargonidina, lo que explica su buena estabilidad al pH y la temperatura.

7.4.1 Cinética de degradación térmica

Se realizó la cinética de degradación térmica para determinar el efecto de la temperatura en la degradación de las antocianinas del camote, el rábano y la campanilla.

Las pruebas se realizaron en un intervalo de temperatura de 60 a 90°C y pH de 3 a 7. Se colocaron las muestras en baño María por 60 minutos, tomando alícuotas cada 15 minutos, y se realizó la determinación de antocianinas totales. Estudios previos demuestran que la degradación térmica de las antocianinas siguen una cinética de primer orden (Wang y Xu. *et al.*, 2007, Harbourne. *et al.*, 2008, Patras. *et al.*, 2010, Jing. *et al.*, 2012, Jie. *et al.*, 2013).

Los parámetros importantes a determinar son: la constante de rapidez, el tiempo de vida media y la energía de activación. Las gráficas con las que se calcularon todos los parámetros se muestran en el anexo 10.2.

Para determinar la constante de rapidez de degradación (k) a cada temperatura se realizaron gráficas del $\ln(C_t/C_0)$ contra el tiempo (figura 16.), siguiendo la ecuación 1:

$$\ln(C_t/C_0) = -k \times t \quad (1)$$

Donde C es la concentración de antocianinas y t el tiempo en minutos.

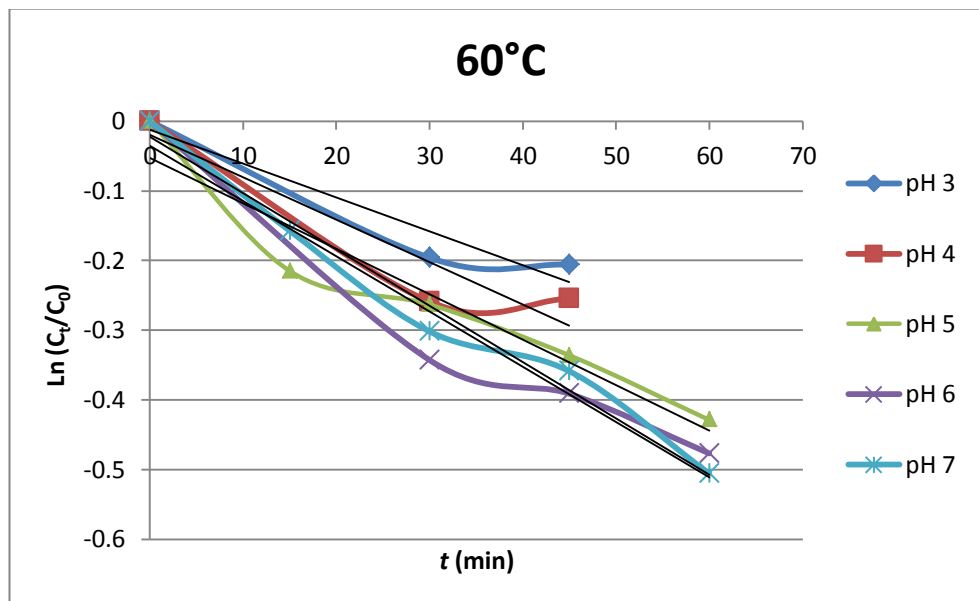


Figura 16. Gráfica del $\ln(C_t/C_0)$ contra el tiempo del camote a pH de 3, 4, 5, 6 y 7 a 60°C.

Se realizó una regresión lineal donde la constante de rapidez es igual a la menos pendiente ($k = -m$).

Con los valores obtenidos de k , el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de las antocianinas fue calculada utilizando la ecuación 2:

$$t_{1/2} = -\text{Ln } 0.5 \times k^{-1} \quad (2)$$

La energía de activación (E_a) fue calculada graficando el $\text{Ln}(k)$ contra $1/T$ (temperatura absoluta en Kelvin), siguiendo la ecuación 3 (figura 17):

$$\text{Ln } k = \text{Ln } k_0 - E_a/RT \quad (3)$$

Se realizó una regresión lineal en donde $m = -E_a/R$ por lo tanto:

$$E_a = -mR. \quad (4)$$

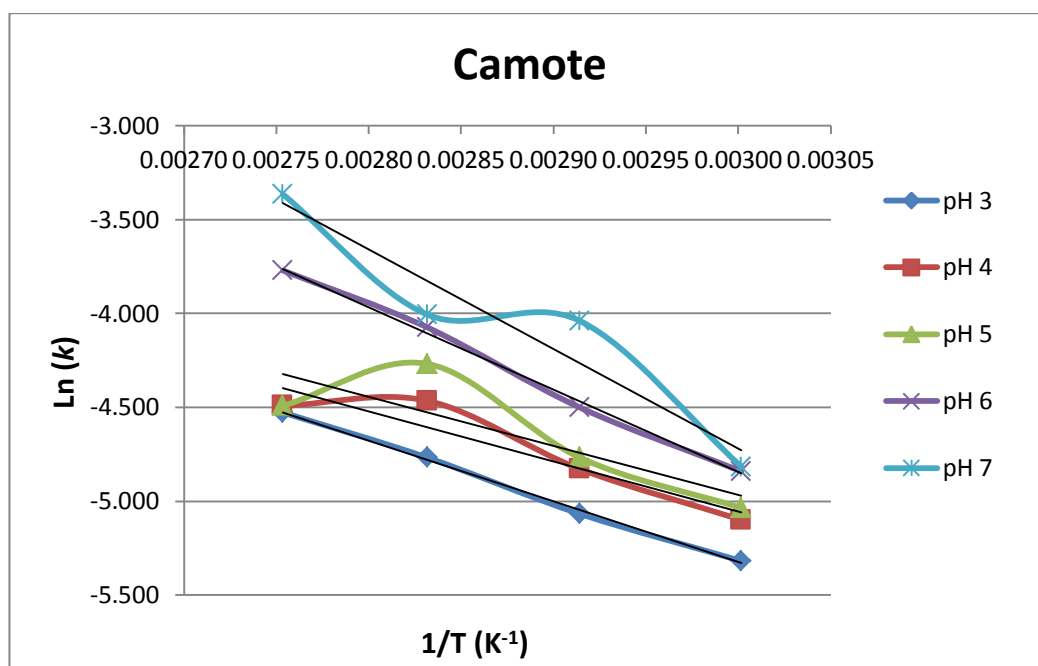


Figura 17. Gráfica del $\text{Ln}(k)$ contra el inverso de la temperatura (K^{-1}) del camote a pH de 3, 4, 5, 6

En la tabla 12, 13 y 14 se muestran los valores de la constante de rapidez, el tiempo de vida media y la energía de activación obtenidos para el camote, el rábano y la campanilla respectivamente.

Tabla 12. Parámetros cinéticos de la degradación de las antocianinas del camote en soluciones acuosas a varios valores de pH.

pH	k (min^{-1})				$t_{1/2}$ (h)				E_a (KJ/mol)
	60°C	70°C	80°C	90°C	60°C	70°C	80°C	90°C	
3	0.0049 (0.958) ^a	0.0063 (0.9814)	0.0085 (0.9469)	0.0108 (0.9898)	2.4	1.8	1.4	1.1	26.85
4	0.0061 (0.94)	0.008 (0.9933)	0.0115 (0.9708)	0.0112 (0.9881)	1.9	1.4	1.0	1.0	22.14
5	0.0065 (0.9632)	0.0085 (0.9881)	0.014 (0.9562)	0.0112 (0.9698)	1.8	1.4	0.8	1.0	21.71
6	0.0079 (0.972)	0.0111 (0.964)	0.017 (0.979)	0.023 (0.9787)	1.5	1.0	0.7	0.5	36.54
7	0.0081 (0.9907)	0.00176 (0.9513)	0.0182 (0.9705)	0.0345 (0.9506)	1.4	0.7	0.6	0.3	44.13

^a Los números en paréntesis son los coeficientes de correlación (r)

Tabla 13. Parámetros cinéticos de la degradación de las antocianinas del rábano en soluciones acuosas a varios valores de pH.

pH	k (min^{-1})				$t_{1/2}$ (h)				E_a (KJ/mol)
	60°C	70°C	80°C	90°C	60°C	70°C	80°C	90°C	
3	0.004 (0.9722) ^a	0.0043 (0.9602)	0.0042 (0.9376)	0.0035 (0.9524)	2.9	2.7	2.8	3.3	2.45
4	0.0049 (0.9719)	0.0043 (0.965)	0.0061 (0.9439)	0.0079 (0.9253)	2.4	2.7	1.9	1.5	17.69
5	0.0042 (0.9821)	0.0052 (0.9905)	0.0074 (0.9958)	0.0098 (0.9837)	2.8	2.2	1.6	1.2	29.06
6	0.0048 (0.9566)	0.0044 (0.9897)	0.0078 (0.9726)	0.0078 (0.9721)	2.4	2.6	1.5	1.5	20.34
7	0.0073 (0.9791)	0.0062 (0.9883)	0.0101 (0.9684)	0.0127 (0.9742)	1.6	1.9	1.1	0.9	21.38

^a Los números en paréntesis son los coeficientes de correlación (r)

Tabla 14. Parámetros cinéticos de la degradación de las antocianinas de la campanilla roja en soluciones acuosas a varios valores de pH.

pH	k (min^{-1})				$t_{1/2}$ (h)				E_a (KJ/mol)
	60°C	70°C	80°C	90°C	60°C	70°C	80°C	90°C	
3	0.0056 (0.9874) ^a	0.0047 (0.9776)	0.0057 (0.9475)	0.0074 (0.99)	2.1	2.5	2.0	1.6	10.09
4	0.0059 (0.9717)	0.0053 (0.9977)	0.0112 (0.993)	0.0139 (0.9463)	2.0	2.2	1.0	0.8	33.17
5	0.0066 (0.9572)	0.0079 (0.9239)	0.0112 (0.9657)	0.0144 (0.9449)	1.8	1.5	1.0	0.8	27.00
6	0.008 (0.9434)	0.0073 (0.983)	0.0114 (0.9559)	0.0156 (0.9664)	1.4	1.6	1.0	0.7	24.39
7	0.0059 (0.9922)	0.008 (0.9992)	0.00138 (0.9537)	0.0165 (0.9932)	2.0	1.4	8.4	0.7	34.60

^a Los números en paréntesis son los coeficientes de correlación (r)

Los valores altos de r confirman que la degradación de antocianinas de las tres muestras sigue una cinética de primer orden, lo que concuerda con lo reportado por Jie. *et al.*, 2013, para el camote y por Verbeyst. *et al*, 2010 para la pelargonidina del rábano.

La figura 21 demuestra que la concentración de antocianinas disminuye con el tiempo y que las antocianinas son degradadas más rápidamente a valores altos de pH y temperatura.

Las tablas de los parámetros cinéticos de la degradación de las antocianinas de las tres muestras (tabla 12, 13 y 14) muestran que conforme aumenta la temperatura, los valores de k aumentan. Como se esperaba, la degradación depende de la temperatura, siendo más rápida a altas temperaturas.

Lo mismo se observa para el pH, al aumentar el pH, los valores de k aumentan. La degradación de las antocianinas también depende del pH, siendo más rápida a valores altos de pH.

Otro parámetro que indica que las antocianinas son menos estables a valores altos de pH y temperatura es el tiempo de vida media ($t_{1/2}$). Se puede observar que al aumentar la temperatura y el pH, el tiempo de vida media disminuye.

En cuanto a la energía de activación, Liang. *et al.*, 2011, reportan que valores grandes de E_a provocan un rápido incremento en la velocidad de la degradación

de las antocianinas cuando la temperatura aumenta. Esto quiere decir que a valores altos de E_a las antocianinas son más estables a temperaturas bajas, mientras que la degradación de las antocianinas es más rápida a altas temperaturas.

Las reacciones con alta energía de activación son más sensibles a los cambios de temperatura, un sustrato en una reacción con energía de activación grande que tiende a ser degradado durante un cambio pequeño de temperatura es menos estable (Hou et al., 2011). De acuerdo a esto podemos observar que las antocianinas del rábano son más estables que las antocianinas del camote y la campanilla ya que su energía de activación es menor en todos los casos, mientras que las antocianinas del camote son las menos estables ya que los valores de energía de activación obtenidos son los más altos.

Esto también se comprueba con el tiempo de vida media, el rango de tiempo de vida media del rábano va de 2.9 a 0.9 h, mientras que el del camote es de 2.4 a 0.3 h.

Con la cinética de degradación pudimos comprobar que la estabilidad de las antocianinas depende de la temperatura y el pH, siendo más estables a pH ácidos y temperaturas bajas. De las tres muestras analizadas, las antocianinas del rábano son las más estables.

7.4.2 Degradación térmica del color.

El color es una propiedad muy importante de los alimentos. Al someter un alimento a un proceso térmico nos interesa que no haya pérdidas de color que puedan ser percibidas por el ojo humano.

Las figuras 18, 19 y 21 muestran el efecto que tiene la temperatura en el color que imparten las antocianinas del rábano, el camote y la campanilla a diferentes valores de pH.

Se puede observar que los cambios de color son más visibles conforme se aumenta el pH.

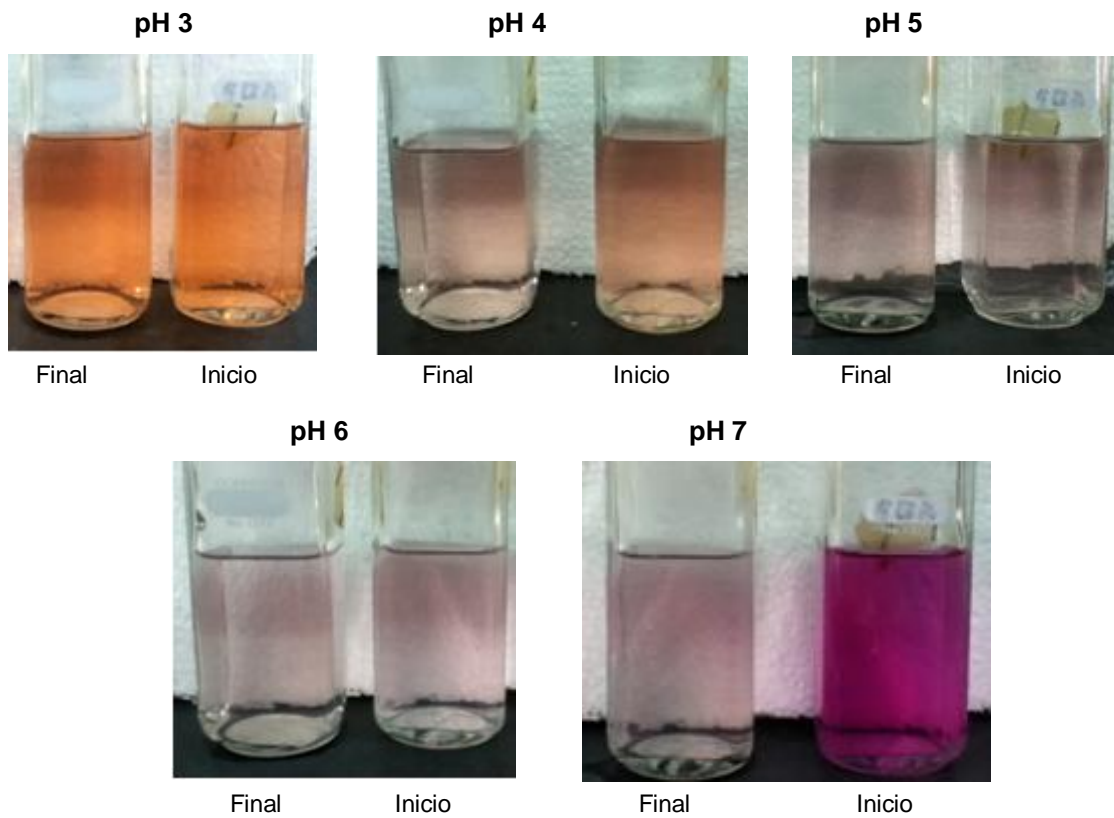


Figura 18. Efecto de la temperatura en el color de las soluciones acuosas a diferentes valores de pH del extracto de rábano.

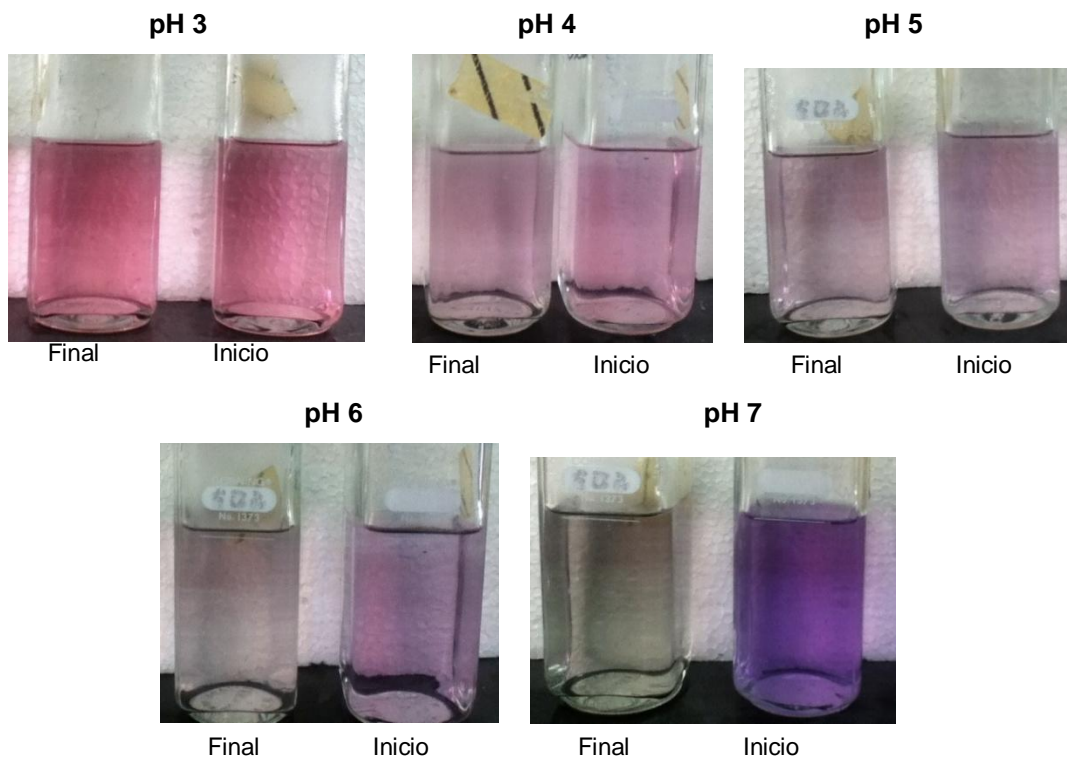


Figura 19. Efecto de la temperatura en el color de las soluciones acuosas a diferentes valores de pH del extracto de camote.

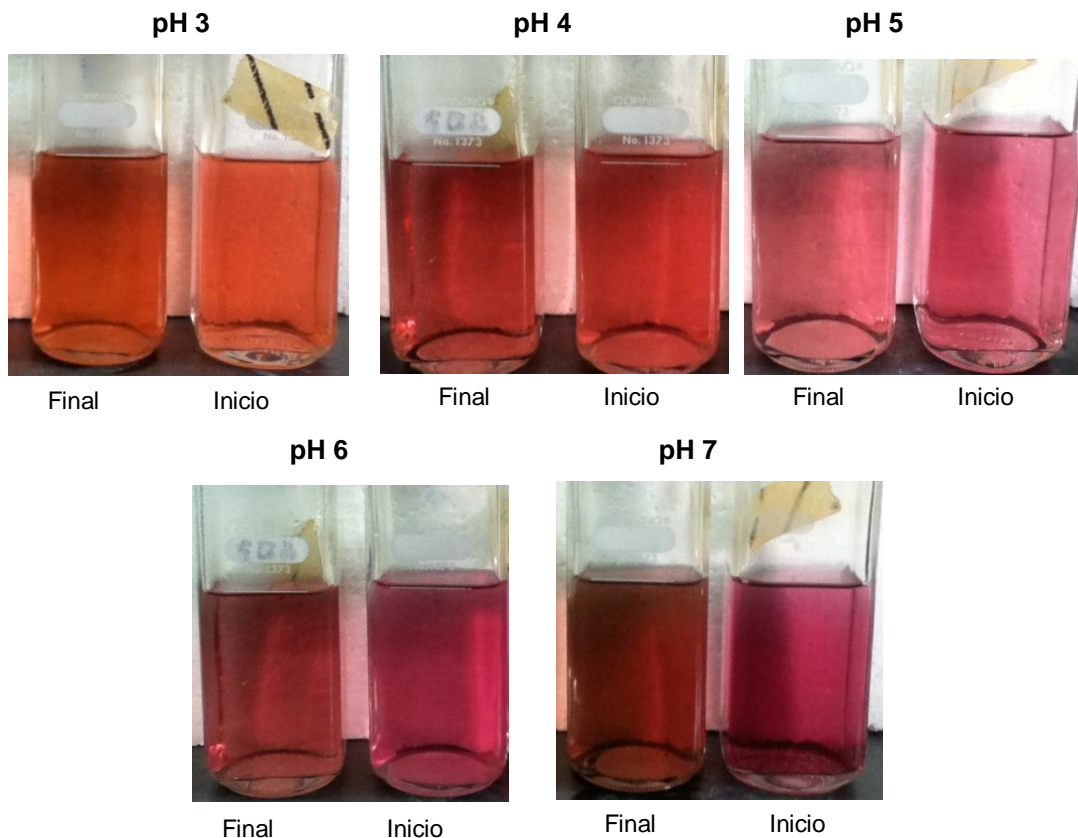


Figura 21. Efecto de la temperatura en el color de las soluciones acuosas a diferentes valores de pH del extracto de campanilla roja.

Se realizó la medición instrumental del color para determinar la degradación de los parámetros de color (L^* , a^* , b^*) de los tres extractos. Se tomaron alícuotas de las muestras al inicio y al final del tratamiento térmico y se realizaron las mediciones en un colorímetro Minolta.

Los valores numéricos obtenidos se muestran en las tablas 15, 16 y 17 (anexo 10.3) en donde cada uno de ellos representa el promedio de 3 réplicas.

En general se puede observar que al aumentar la temperatura hay un aumento en la luminosidad (L^*) acompañado con la disminución del parámetro a^* y un ligero aumento del parámetro azul-amarillo b^* . Este comportamiento es similar al reportado por Fernández-López, *et al.*, 2013 en algunas soluciones acuosas de antocianinas.

El atributo L va de 0 a 100 e indica la luminosidad de la muestra, valores grandes indican que la muestra es clara. Debido a la baja estabilidad de las antocianinas a valores grandes de pH y temperatura, se observa que para las tres muestras el

valor de L aumenta al aumentar el pH y la temperatura por lo que la muestra se hace más clara.

La tendencia hacia el color rojo se mide con el atributo “a”. Como se mencionó anteriormente, las antocianinas son más susceptibles a la degradación a valores grandes de pH y temperatura así que al aumentar la temperatura y el pH el valor de a disminuye.

El atributo “b” muestra la tendencia hacia el color amarillo si es positivo o hacia el azul si es negativo. El extracto de camote es el único que presenta valores negativos de b a pH de 3 y 4 ya que a estos valores las soluciones acuosas presentan un color morado.

Se puede observar que en las tres muestras el valor de b disminuye a pH 3, 4 y 5 y a pH 6 y 7 aumenta. De acuerdo con lo reportado por Cavalcanti, *et al.*, 2011, a pH mayores de 6 se lleva a cabo la degradación de las antocianinas y la formación de productos cafés o amarillentos lo que explica que el valor de b aumente.

El atributo C indica la concentración del color en la muestra. Este atributo también disminuye al aumentar el pH y la temperatura.

En la figura 22 se representan los ángulos y la representación de los atributos de color.

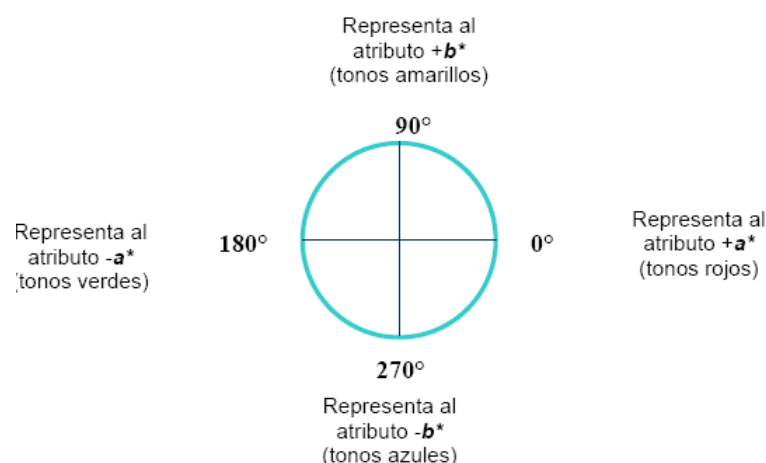


Figura 22. Ángulos representativos de los atributos de color.

Los valores de h° del rábano y la campanilla se encuentran ubicados en el primer cuadrante (0 a 90) a valores bajos de pH el valor de h es pequeño ya que

las muestras tienden más a los tonos rojos, al aumentar el pH y la temperatura el valor de h aumenta acercándose más a los tonos amarillos.

Los valores de h del camote se encuentran entre los tonos azules, rojos y amarillos y al igual que el rábano y la campanilla, al aumentar el pH y la temperatura el valor de h aumenta acercándose más a los tonos amarillos.

Para determinar si hay diferencia entre los cambios del color entre las tres muestras se calculó la ΔE^* que representa la diferencia total entre los parámetros L^* , a^* y b^* de las muestras.

Tabla 15. Valores de ΔE^* calculados para las tres muestras a diferentes valores de pH y temperatura.

T (°C)	pH 3			pH 4			pH 5		
	Rábano	Camote	Camp.	Rábano	Camote	Camp.	Rábano	Camote	Camp.
60	0.594	0.335	0.349	0.986	0.956	0.351	0.994	1.076	0.664
70	0.487	1.034	0.447	0.951	1.281	0.460	1.285	1.443	0.658
80	0.961	1.146	0.901	1.245	1.595	0.978	1.316	1.469	1.367
90	1.495	1.491	1.062	1.510	1.420	1.231	1.401	1.514	1.448
T (°C)	pH 6			pH 7					
	Rábano	Camote	Camp.	Rábano	Camote	Camp.			
60	1.118	1.035	0.858	1.133	1.421	1.374			
70	1.177	1.589	1.032	1.256	1.802	1.510			
80	1.313	1.718	1.131	1.436	2.003	1.625			
90	1.413	1.802	1.621	1.773	1.874	2.161			

Como se puede observar en la tabla 15 y en estudios realizados por Jing, *et al.*, 2012 y Fernández-López, *et al.*, 2013; al aumentar la temperatura y el pH, el valor de ΔE^* aumenta lo que indica que los cambios en el color son mayores.

Con la medición de la degradación de color se comprobó que, de las tres muestras analizadas, el extracto de rábano es el más estable a la temperatura y el pH ya que se obtuvieron los valores más bajos de ΔE^* mientras que para el camote se obtuvieron los más altos.

7.5 Estabilidad de las antocianinas a la luz.

Las pruebas de estabilidad de las antocianinas a la luz se realizaron por 9 días. Se colocaron las soluciones acuosas a pH 3 en envases de vidrio transparente, se expusieron a la luz solar y se tomaron alícuotas cada día. Se realizaron las mediciones de antocianinas totales.

La figura 23 muestra la gráfica del porcentaje de antocianinas remanentes contra el tiempo. Se puede observar que a diferencia de la temperatura y el pH, las antocianinas del rábano son las menos estables a la luz, mientras que las antocianinas de la campanilla son las más estables.

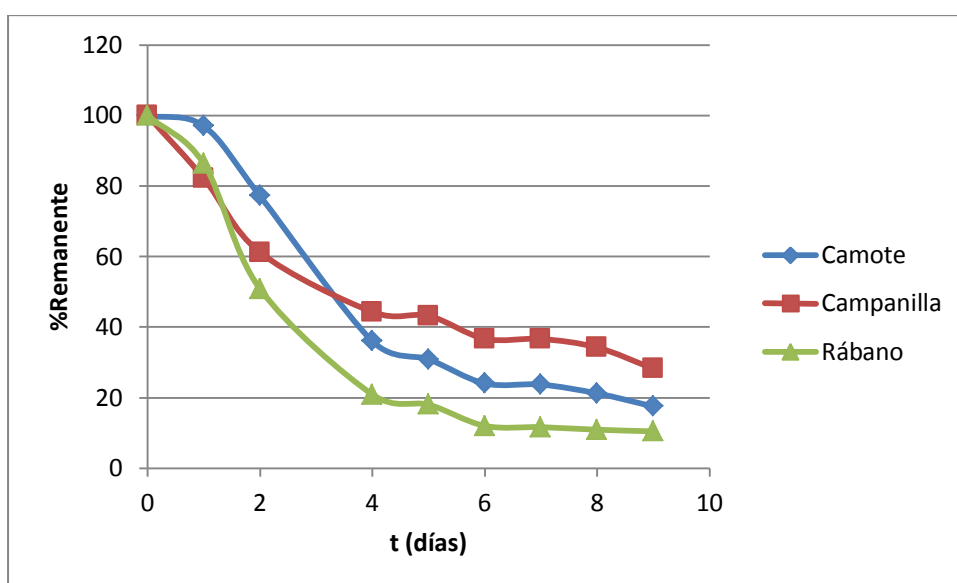


Figura 23. Gráfica del porcentaje de antocianinas remanentes contra el tiempo del camote en donde se observa el efecto de la luz en las antocianinas del camote, la campanilla y el rábano a pH 3.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% para determinar si existe una diferencia mínima significativa entre el porcentaje de antocianinas remanente obtenido para las tres muestras. En la tabla 16 se reportan los valores de F calculada y los valores críticos de F.

Tabla 16. Valores de F obtenidos a partir del análisis de varianza ANOVA

F calculada	Valor crítico para F
1.11	3.47

El valor de F calculada es menor que el valor crítico por lo que se concluye que no hay diferencia mínima significativa entre el porcentaje remanente de antocianinas de las tres muestras lo que indica que la luz afecta de la misma manera en la degradación de las antocianinas del camote, el rábano y la campanilla.

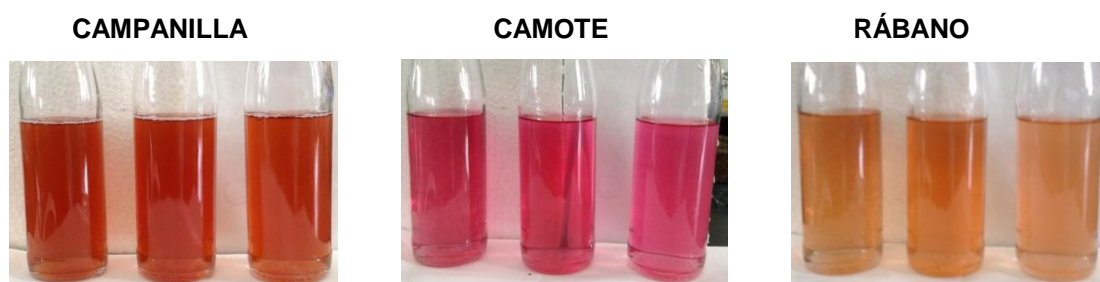
La luz es esencial para la biosíntesis de las antocianinas pero también acelera su degradación. Estudios realizados por Maier *et al.* (2009) demostraron que la luz tiene un efecto negativo en la estabilidad de las antocianinas durante el almacenamiento disminuyendo considerablemente el contenido de fenoles y de antocianinas.

Otras investigaciones (Cavalcanti *et al.*, 2011) reportan patrones incongruentes en la degradación de las antocianinas debido a la exposición a la luz, estos resultados fueron atribuidos a una variación en la estructura de las antocianinas.

7.5.1 Degradación del color de las soluciones expuestas al sol.

Como se muestra en la figura 24, la degradación del color de las soluciones acuosas debido a la exposición a la luz solar es evidente.

Día 1



Día 9

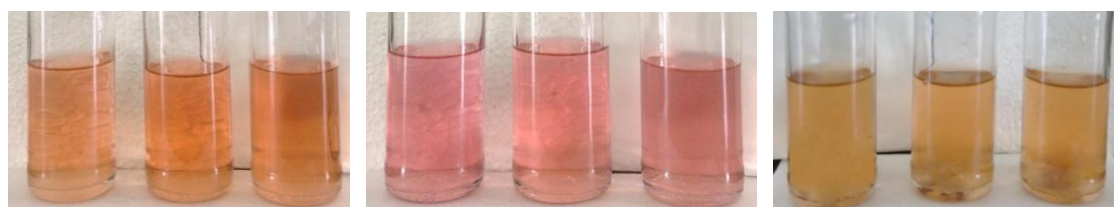


Figura 24. Efecto de la luz en el color de las soluciones acuosas con extracto de campanilla, camote y rábano a pH 3.

Para la medición instrumental de color se tomaron muestras los días 0, 2, 4, 6, 8 y 9 de las pruebas de estabilidad a la luz. Los atributos de color L^* , a^* , b^* , C^* y h° se midieron con un colorímetro Minolta.

En la figura 25 se muestran los valores numéricos obtenidos para cada atributo así como su variación en el tiempo en el que se desarrolló la prueba.

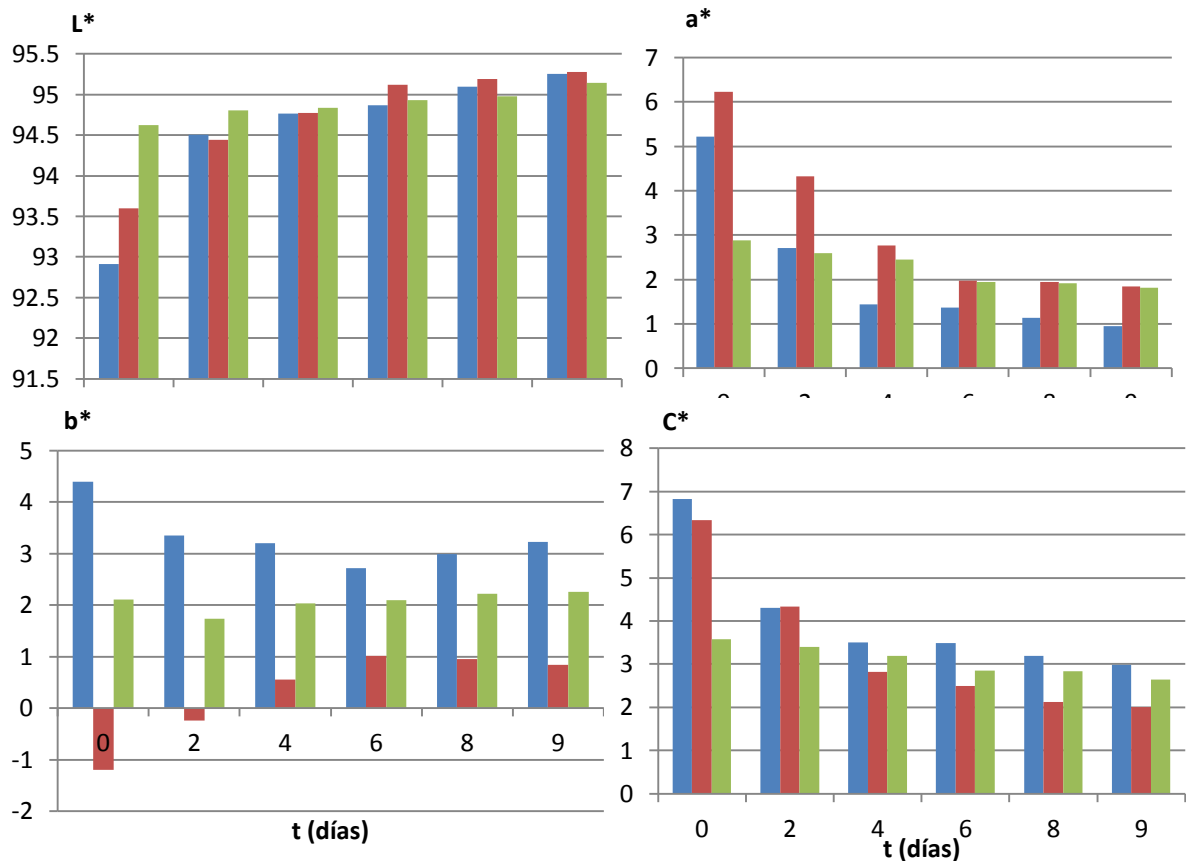


Figura 25. Valores numéricos de los atributos de color en las soluciones acuosas de rábano, camote y campanilla

Se puede observar que al aumentar el tiempo de exposición a la luz, la luminosidad aumenta mientras que el atributo a y C disminuyen. Que el valor de a disminuya indica que el color rojo se hace menos intenso lo que provoca que la muestra se haga más clara (la luminosidad aumenta) y a su vez que el atributo C, que indica la concentración de color en la muestra, también disminuya.

Se observa que el valor del atributo b al principio disminuye y después del día 4 o 6 aumenta, esto se debe, como ya se había mencionado anteriormente, a

que la durante la degradación de las antocianinas se forman productos de color café o amarillo.

Para determinar si existe diferencia significativa entre los cambios en los atributos de color de las tres muestras entre el inicio y el final del experimento, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. De acuerdo a los resultados reportados en la tabla 17 no existe diferencia mínima significativa entre los cambios en los atributos de color de las tres muestras por lo que se concluye que la exposición a la luz solar afecta de igual manera al color impartido por los extractos del camote, el rábano y la campanilla roja.

Tabla 17. Valores de F obtenidos a partir del análisis de varianza ANOVA

<i>Atributo</i>	<i>L*</i>	<i>a*</i>	<i>b*</i>	<i>C*</i>
F calculada	1.018	1.143	2.567	1.152
Valor Critico para F	3.885	3.885	3.885	3.885

Etapa 3. Aplicación del colorante a alimentos.

Con el objetivo de observar el comportamiento de los tres colorantes en diferentes matrices alimenticias se procedió a su aplicación en la elaboración de bebidas y gelatinas.

7.6 Estabilidad de las antocianinas en bebidas.

Las bebidas se elaboraron con un pH de 3 y 200mg de extracto, se pasteurizaron (86°C por 2 minutos) y se envasaron en envases de vidrio transparente. Se mantuvieron a temperatura ambiente y se determinó la concentración de antocianinas totales al inicio y cada semana durante 6 semanas.

Como se puede observar en la figura 26 el cambio en el color después de 6 semanas no se puede apreciar a simple vista.



Figura 26. Coloración de las bebidas al inicio y después de 6 semanas.

En la gráfica del porcentaje remanente de antocianinas contra el tiempo (figura 27) se puede observar que las antocianinas de la campanilla son las menos estables en esta matriz ya que después de 6 semanas quedan solamente alrededor del 65% de las antocianinas iniciales. Contrario a lo que se esperaba, el extracto del camote es el más estable porque pasadas las 6 semanas aún quedan el 80% de las antocianinas iniciales.

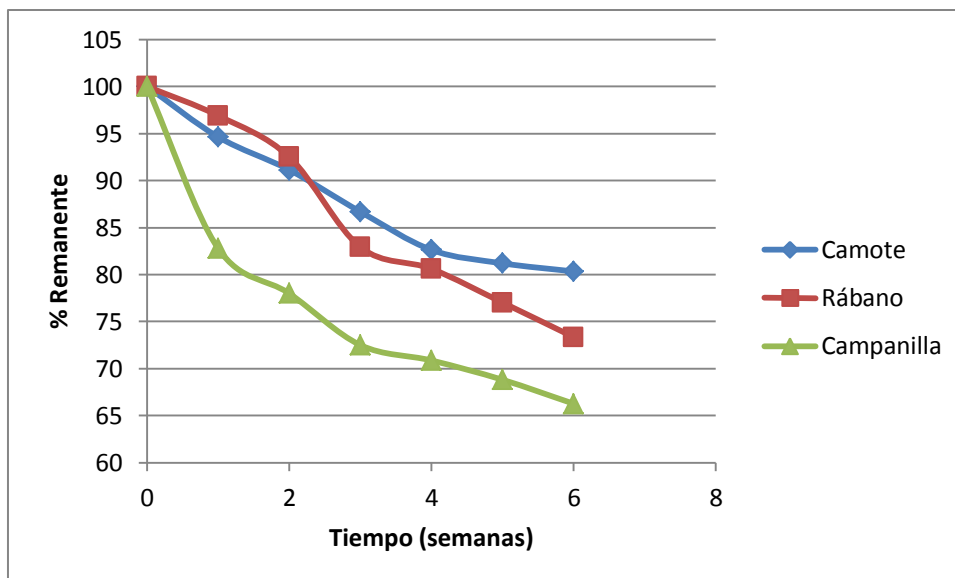


Figura 27. Grafica del porcentaje de antocianinas remanente contra el tiempo de las bebidas elaboradas con extracto de camote, rábano y campanilla.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% el cual arrojó que existe una diferencia mínima significativa entre el porcentaje de antocianinas remanentes obtenido para las tres muestras. En la tabla 18 se reportan el valor de F calculada y su valor crítico.

Tabla 18. Valores de F obtenidos a partir del análisis de varianza ANOVA

<i>F calculada</i>	<i>Valor crítico para F</i>
15.19	9.552

Con la prueba del rango múltiple Duncan se determinó que solo hay diferencia significativa entre el porcentaje de antocianinas remanentes del camote y la campanilla.

A pesar de que en las pruebas de estabilidad a la temperatura y la luz el extracto del camote no obtuvo los mejores resultados, en la elaboración de bebidas resultó ser el extracto más estable.

El azúcar es uno de los principales ingredientes de las bebidas. El efecto de la adición de azúcar en la estabilidad de la antocianina depende de la estructura, la concentración y el tipo de azúcar. Los azúcares y sus productos de degradación, generalmente disminuyen la estabilidad de las antocianinas. (Cavalcanti *et al.*, 2011.)

Se han realizado estudios del efecto de la sacarosa en la estabilidad de las antocianinas de extractos cuya antocianinas principales, al igual que la campanilla, tienen como base la cianidina (Tsai *et al.*, 2005; Dirby *et al.*, 2001) en donde se demuestra que la sacarosa tiene un efecto hipercromico después del calentamiento en las antocianinas y los productos cafés derivados aumentan la decoloración.

Sin embargo se ha reportado que la adición de sacarosa aumenta el tiempo de vida media de la pelargonidina (Sadilova *et al.*, 2009), antocianina principal en el camote lo que explica su alta estabilidad en las bebidas.

7.7 Estabilidad de las antocianinas en gelatinas.

Las gelatinas tienen un pH de 4 y se elaboraron con 100mg de extracto. Se guardaron en refrigeración a 4 °C por 6 semanas, realizando la determinación de antocianinas totales desde el inicio y cada semana.

Como se puede observar en la figura 28 el cambio en el color después de 6 semanas es muy evidente.

Inicio



Camote

Rábano

Campanilla

Semana 6



Camote

Rábano

Campanilla

Figura 28. Coloración de las gelatinas al inicio y después de 6 semanas.

Como se observa en la gráfica del porcentaje remanente de antocianinas contra el tiempo (figura 29) los tres extractos tuvieron una gran pérdida de antocianinas (alrededor del 90% inicial). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% el cual arrojó que no existe diferencia mínima significativa entre el porcentaje de antocianinas remanentes obtenido para las

tres muestras. En la tabla 19 se reportan el valor de F calculada y su valor crítico.

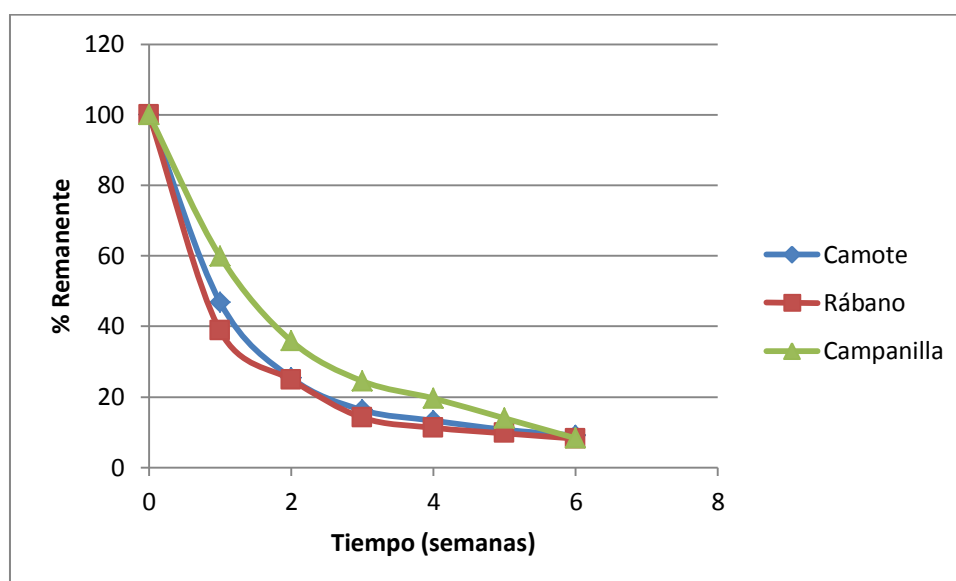


Figura 29. Grafica del porcentaje de antocianinas remanente contra el tiempo de las gelatinas elaboradas con extracto de camote, rábano y campanilla

Tabla 19. Valores de F obtenidos a partir del análisis de varianza ANOVA

<i>F calculada</i>	<i>Valor crítico para F</i>
0.115	9.552

La baja estabilidad de los extractos de antocianinas en las gelatinas a diferencia de las bebidas, se debe a que el pH en las gelatinas es más alto y como ya se mencionó anteriormente, las antocianinas son más estables a valores bajos de pH.

Además un ingrediente importante en la elaboración de las gelatinas es la grenetina, que está formada principalmente por colágeno, una proteína fibrosa que se encuentra en el tejido conectivo. Las antocianinas son inestables y susceptibles a la degradación en la presencia de otros compuestos como enzimas, flavonoides y proteínas (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

Mazzaracchio *et al.*, 2011 estudiaron la interacción entre las proteínas y las antocianinas en soluciones acuosas ácidas, comprobando la formación de un complejo que modifica la estructura de las antocianinas por lo que disminuye la absorbancia de la solución.

CONCLUSIONES.

Del rábano, la campanilla y el camote morado se obtuvieron extractos ricos en antocianinas los cuales se purificaron y se cuantificaron las antocianinas totales. Se intentó diferenciar las antocianinas aciladas y las no aciladas en dos sistemas de Cromatografía en Capa Fina; gel de sílice y celulosa, se concluyó que el perfil de antocianinas obtenido en la Cromatografía en Capa Fina no es un método adecuado para la identificación de antocianinas aciladas.

Con la determinación del perfil de antocianinas mediante la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se identificaron algunas de las posibles antocianinas aciladas presentes en las muestras y se observó que de las tres muestras, el rábano es la que tiene un mayor número de antocianinas aciladas.

Realizando la cinética de degradación de las antocianinas, se evaluó la estabilidad a la temperatura (60, 70, 80 y 90°C) y al pH (3, 4, 5, 6 y 7) de los tres extractos. Se comprobó que al aumentar la temperatura y el pH las antocianinas son menos estables ya que el valor de la constante de rapidez aumenta y el tiempo de vida media disminuye.

Se concluyó que de los tres extractos, el del rábano es el más estable ya que sus valores de constantes de rapidez fueron los menores y los de tiempo de vida media los mayores, mientras que el extracto de camote es el menos estable. Además se evaluó la degradación térmica del color mediante el sistema CIELab y se calculó la diferencia total del color (ΔE^*) siendo el extracto de rábano el que tuvo menores cambios en el color y el camote el que tuvo cambios más notables en el color.

Se evaluó la estabilidad de los extractos a la luz. Se expusieron a la luz soluciones acuosas a pH 3 de los extractos y se determinaron las antocianinas totales remanentes después de 9 días; el análisis de varianza ANOVA reveló que no existe diferencia significativa entre las antocianinas remanentes de las tres muestras. Para complementar el experimento, se evaluaron los cambios en

los atributos de color L^* , a^* y b^* de los tres extractos y se concluyó que la luz afecta de igual manera a las antocianinas de los tres extractos.

Finalmente para evaluar la estabilidad de los extractos en diferentes alimentos, se aplicaron como colorantes en la elaboración de bebidas y gelatinas. Se comprobó que las antocianinas de los tres extractos se pueden utilizar como colorantes en alimentos de pH ácidos como las bebidas. A pesar de su baja estabilidad el extracto de camote resultó ser el colorante más estable en la elaboración de bebidas ya que la presencia de azúcares favoreció la estabilidad de sus antocianinas.

En el caso de la gelatina, la estabilidad de los tres extractos no fue la deseada ya que el pH era mayor, además de que la presencia de proteínas disminuyó su estabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

Badui, S., 1999. Color. En: Badui S. ed. *Química de los alimentos*. México: Pearson Education, 377-406.

Bridle P., Timberlake C., 1997. Anthocyanins as natural food colours- selected aspects. *Food Chemistry*, 58, pp. 103-109.

Bueno J., Sáez-Plaza P., Ramos-Escudero F., Jiménez A., Fett R., Asuero A., 2012. Analysis an Antioxidant Capacity of anthocyanin pigments. Part II: Chemical structure, color and intake of anthocyanins. *Analytical Chemistry*, 42, pp. 126-151.

Cabrita L., Fossen T., Andersen O., 2000. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 68, pp. 101-107.

Castañeda-Ovando A., Pacheco M., Hernández M., Rodríguez J., Galán C., 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, pp. 859–871.

Cavalcanti R., Santos D., Meireles M., 2011. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Research International*, 44, pp. 499-509.

Charron C., Kurilich A., Clevidence B., Simon P., Harrison D., Britz S., Baer D., Novotny J., 2009. Bioavailability of anthocyanins from purple carrot juice: effects of acylation and plant matrix. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 57, pp. 1226-1230.

Cheyrier V., 2012. Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemical society of Europe*, 11, pp. 153-177.

Dyrby M., Westergaard N., Stapelfeldt H., 2001. Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chemistry*, 72, pp. 431–437.

Eiro M., Heinonen M., 2002. Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect of intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp. 7461-7466.

Fan G., Han Y., Gu Z., Gu F., 2008. Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato culture. *Food Science and Technology*, 41, pp. 1412–1416.

Fennema, O., 1996. Pigmentos y otros colorantes. En: Fennema O. ed. *Química de los alimentos*. USA: Acribia, 615-657.

Fernández-López J., Angosto J., Giménez P., León G., 2013. Thermal stability of selected natural red extracts used as food colorants. *Plant Food Human Nutrition*, 68, pp. 11-17.

Froehlicher T., Martin-Nizard F., Cleenewerck P., Hilbert J., Trotin F., 2009. Phenolics profiles and Antioxidative Effects of Hawthorn cell Suspensions, Fresh Fruits, and Medicinal dried parts. *Food Chemistry*, 115, pp. 897-903.

Garzón G., Wrolstad R., 2001. The stability of pelargonidin-based anthocyanins at varying water activity. *Food Chemistry*, 75, pp. 185-196.

Gilabert E., (2002). *Medida del color*, Editorial Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, pp.138-139.

Giordano L., Coletta W., Tamburelli C., D'Imperio M., Crescente M., Silvestri C., Rapisarda P., Reforgiato G., De Curtis A., Iacoviello L., Gaetano G., Rotilio D., Cerletti C., Bendetta D., 201. Four-week ingestion of blood orange results in measurable anthocyanin urinary levels but does not affect cross-over study in healthy volunteer. *European Journal of Nutrition*, 51, pp. 541-548.

Giusti M., Wrolstad R., 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14, pp. 217–225.

Goda Y., Shimizu T., Kato Y., Nakamura M., Maitini T., Yamada T., Terahara N., Yamaguchi M., 1996. Two acylated anthocyanins from purple sweet potato. *Phytochemistry*, Vol. 44, No. 1, pp. 183-186.

Harbourne N., Jacquier J., Morgan D., Lyng J., 2008. Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods. *Food Chemistry*, 111, pp. 204-208.

Heinonen, I., Meyer, A., Frankel E., 1998. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), pp. 4107–4112.

Hou D., (2011). Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Current Molecular Medicine*, 3, pp. 149–159.

Ignat I., Volf I., Popa V., 2011. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, pp. 1821–1835.

Ikeda T., Yamazaki K., Kumakura H., Hamamoto H., 2009. Effect of high temperature on fruit quality of pot-grown strawberry plants. *Acta Horticulturae*, 842, pp. 679–682.

Jie L., Xiao-ding L., Yun Z., Zheng-dong Z., Zhi-ya Q., Meng L., Shao-hua Z., Shuo L., Meng W., Lu Q., 2013. Identification and thermal stability of purple-fleshed sweet potato anthocyanins in aqueous solutions with various pH values and fruit juices. *Food Chemistry*, 136, pp. 1429–1434.

Jiménez N., Bohuon P., Lima J., Dornier M., Vaillant F., Pérez, A., 2010. Kinetics of anthocyanin degradation and browning in reconstituted blackberry juice treated at high temperatures (100–180 °C). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, pp. 2314–2322.

Jing P., Zhao S., Ruan S., Xie Z., Dong Y., Yu L., 2012. Anthocyanin and glucosinolate occurrences in the roots of Chinese red radish (*Raphanus sativus* L.), and their stability to heat and pH. *Food Chemistry*, 133, pp. 1569–1576.

Kara S., Alben E., 2013. Thermal degradation kinetics of anthocyanins and visual color of Urmu mulberry (*Morus nigra* L.). *Journal of Food Engineering*, 116, pp. 541-547.

Kong J., Chiaa L., Goha N., Chiaa T., Brouillard R., 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, pp. 923–933.

Kirca A., Ozkan M., Cemeroglu B., 2007. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry*, 101, pp. 212–218.

Liang L., Shao-qian C., Si-yi P., 2011. Thermal degradation kinetics of three kinds of representative anthocyanins obtained from blood orange. *Agricultural Sciences in China*, 10, pp. 642-649.

Maier T., Fromm M., Schieber A., Kammerer D., Carle R., 2009. Process and storage stability of anthocyanins and non-anthocyanin phenolics in pectin and gelatin gels enriched with grape pomace extracts. *European Food Research and Technology*, 104, pp. 732–739.

Mazzarachio P., Tozzi S., Boga C., Forlani L., Pifferi P., Barbiroli G., 2011. Interaction between gliadins and anthocyanin derivatives. *Food Chemistry*, 129, pp. 1100-1107.

Noda Y., Kneyuki N., Igarashi K., Mori A., Packer L., 2000. Antioxidant activity of nanusin, an anthocyanin in eggplant peels. *Toxicology*, 148, pp. 119–123.

Norio S., Fumi T., Kichiji K., Shigeru I., Toshio H., 1998. Acylated cyanidin 3-sophorosides in the brownish-red flowers of *Ipomea purpurea*. *Phytochemistry*, 49, pp. 875-880.

Novotny J., Clevidence B., Kurilich A., 2012. Anthocyanin kinetics are dependent on anthocyanin structure. *British Journal of Nutrition*, 107, pp. 504-509.

Oren-Shamir M., 2009. Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants?. *Plant Science*, 177, pp. 310-316.

Otsuki T, Matsufujia H., Takedaa M., Toyodab M., Godab Y, 2012. Acylated anthocyanins from red radish (*Raphanus sativus* L.). *Phytochemistry*, 60, pp. 79–87.

Patras A., Bruton N., O'Donnell C., Tiwari B., 2010. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, 21, pp. 3-11.

Record I., Dreosti I., McInerney J., 2001. Changes in plasma antioxidant status following consumption of diets high or low in fruit and vegetables or following dietary supplementation with an antioxidant mixture. *British Journal of Nutrition*, 85, pp. 459–464.

Sadilova E., Stintzing F., Kammerer D., Carle R., 2009. Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. *Food Research International*, 42, pp. 1023-1033.

Sadilova E., Carle R., Stitzing F., 2007. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and *in vitro* antioxidant capacity. *Mol. Nutr Food Res.*, 51, 1461-1471.

Tatsuzawa F., Toki K., Saito N., Shinoda K., Shigihara A., Honda T., 2008. Anthocyanin occurrence in the root peels, petioles and flowers of red radish (*Raphanus sativus* L.). *Dyes and Pigments*, 79, pp. 83-88.

Tsai P., Delva L., Yu T., Huang Y., Dufosse L., 2005. Effect of sucrose on the anthocyanin and antioxidant capacity of mulberry extract during high temperature heating. *Food Research International*, 38, pp. 1059–1065.

Verbeyst L., Oey I., Van del Planceken I., Hendrickx M., Loey A., 2010. Kinetic study on the thermal and pressure degradation of anthocyanins in strawberries. *Food Chemistry*, 123, pp. 269-274.

Wang L., Sun X., Cao Y., Wang L., Li F., Wang Y., 2010. Antioxidant and pro-oxidant properties of acylated pelargonidin derivatives extracted from red radish (*Raphanus sativus var. niger*, *Brassicaceae*). *Food and Chemical Toxicology*, 48, pp. 2712–2718.

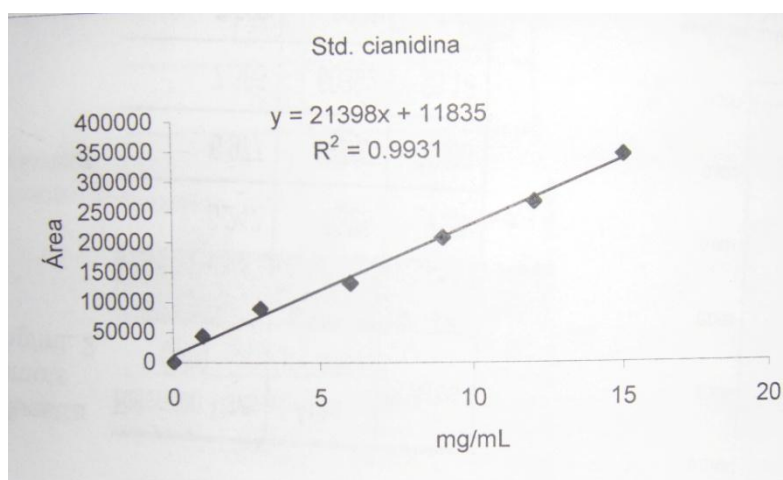
Wang W., Xu S., 2007. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*, 82, pp. 271-275.

Wissgot U., Bortlik K., 1996. Prospects for new natural food colorants. *Trends in Food Science & Technology*, 7, pp. 298-302.

Yang Z., Han Y., Gu Z., Fan G., Chen Z., 2008. Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zea mays* L.) cob. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, pp. 341-347.

ANEXOS

4.1 Curva patrón cianidina-3-glucosido del aguacate.



Donde x = al tiempo de retención de la cianidina

X= 5.734 (intervalo de 5.66 a 5.81)

4.2 Gráficas para obtener los parámetros (k , $t_{1/2}$ y E_a) de la cinética de degradación térmica de las antocianinas.

CAMOTE

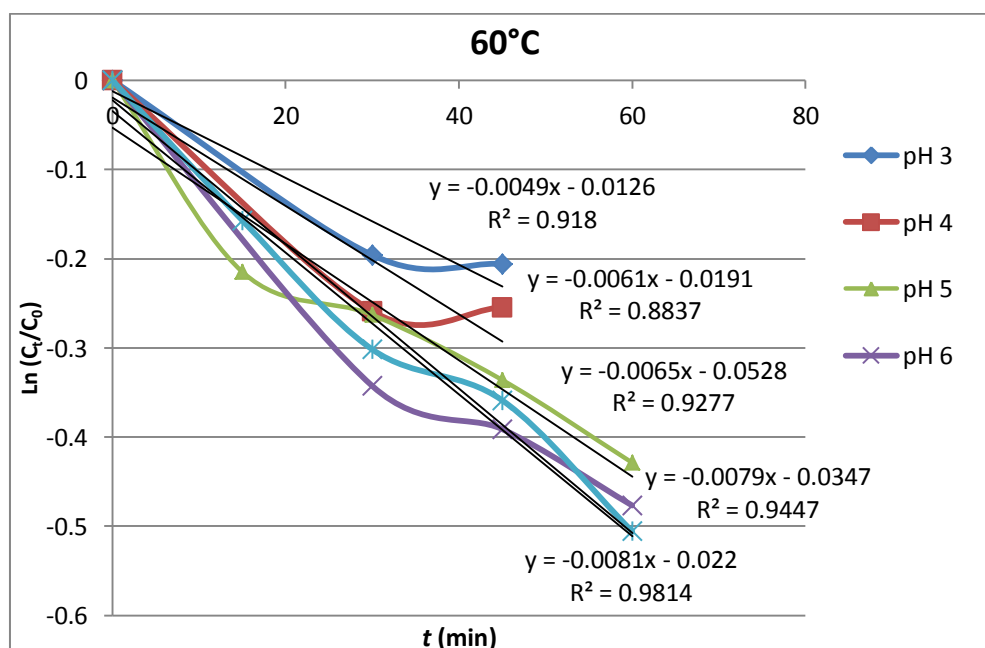


Figura34. Gráfica del $\ln(C_t/C_0)$ contra el tiempo del camote a pH de 3, 4, 5, 6 y 7 a 60°C.

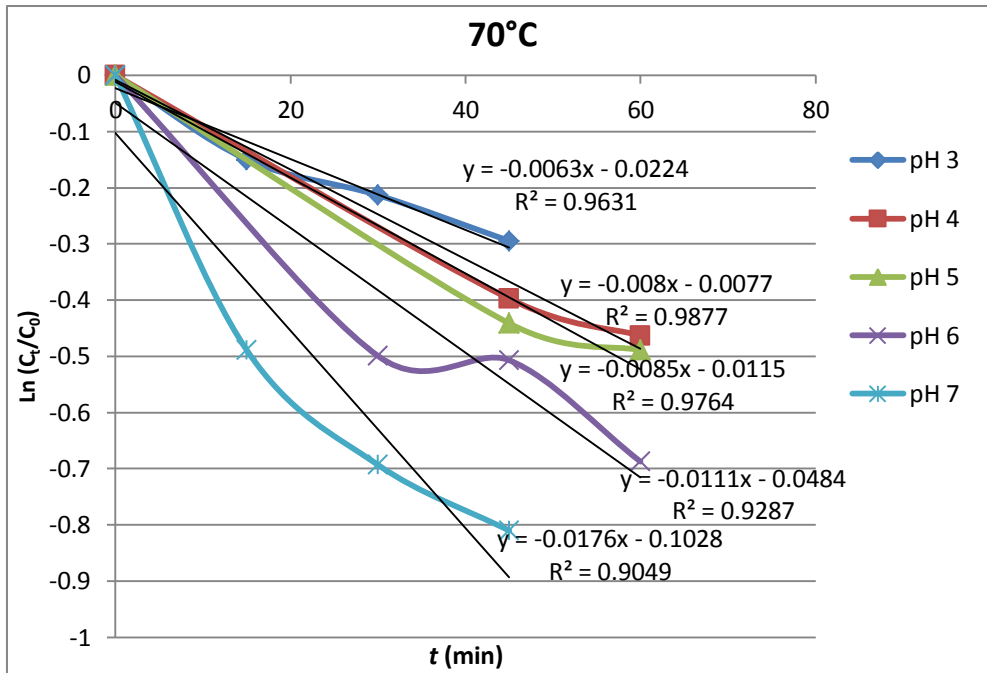


Figura 35. Gráfica del Ln (Ct/C₀) contra el tiempo del camote a pH de 3, 4, 5, 6 y 7 a 70°C.

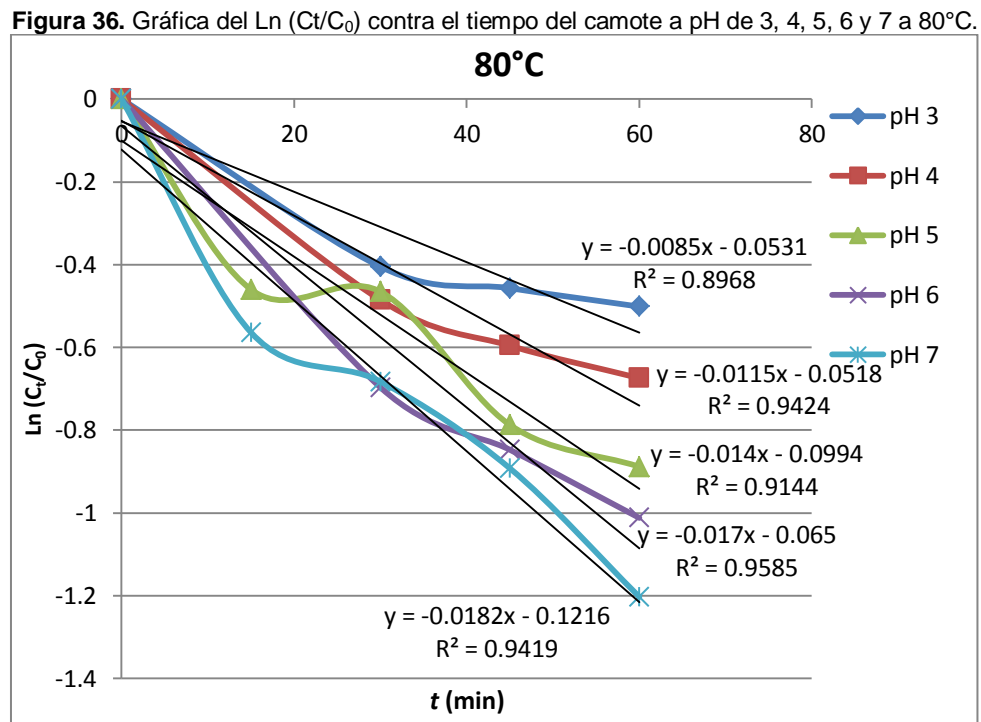


Figura 36. Gráfica del Ln (Ct/C₀) contra el tiempo del camote a pH de 3, 4, 5, 6 y 7 a 80°C.

Figura 37. Gráfica del $\ln(C_t/C_0)$ contra el tiempo del camote a pH de 3, 4, 5, 6 y 7 a 90°C.

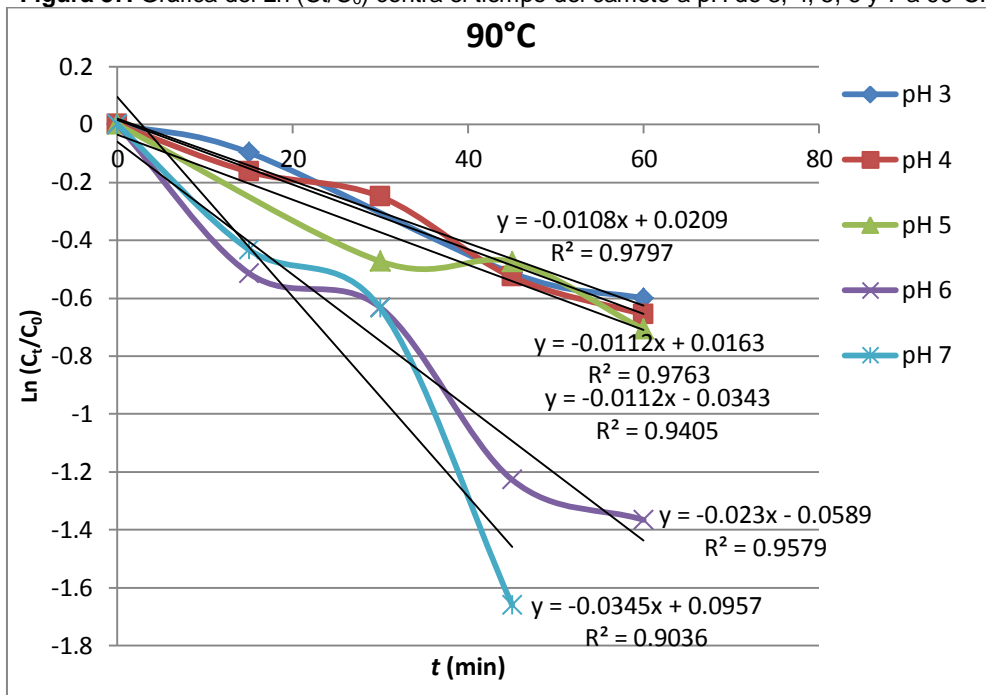
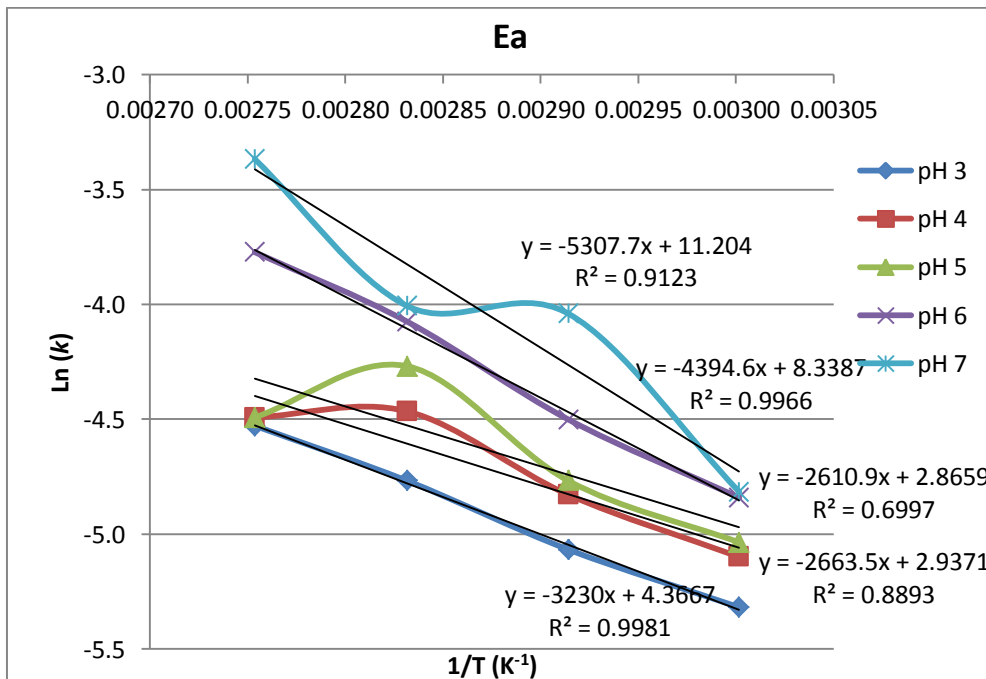


Figura 38. Gráfica del $\ln(k)$ contra el inverso de la temperatura (K^{-1}) del camote a pH de 3, 4, 5, 6.



RÁBANO

Figura 39. Gráfica del $\ln(C_t/C_0)$ contra el tiempo del rábano a pH de 3, 4, 5, 6 y 7 a 60°C.

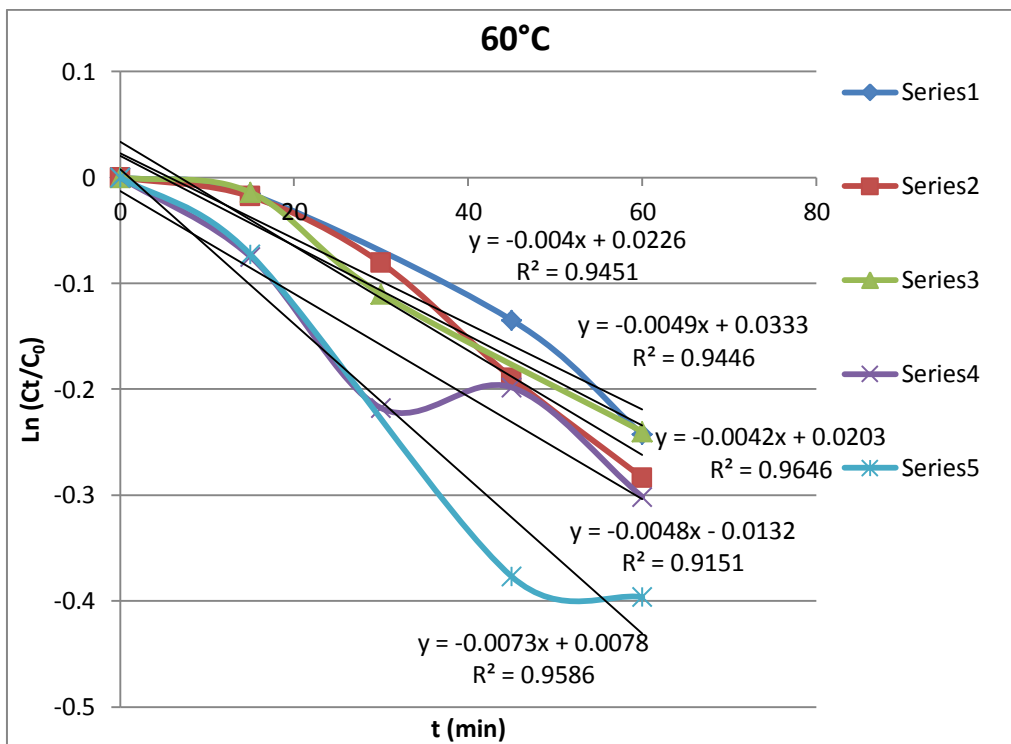


Figura 40. Gráfica del $\ln(C_t/C_0)$ contra el tiempo del rábano a pH de 3, 4, 5, 6 y 7 a 70°C.

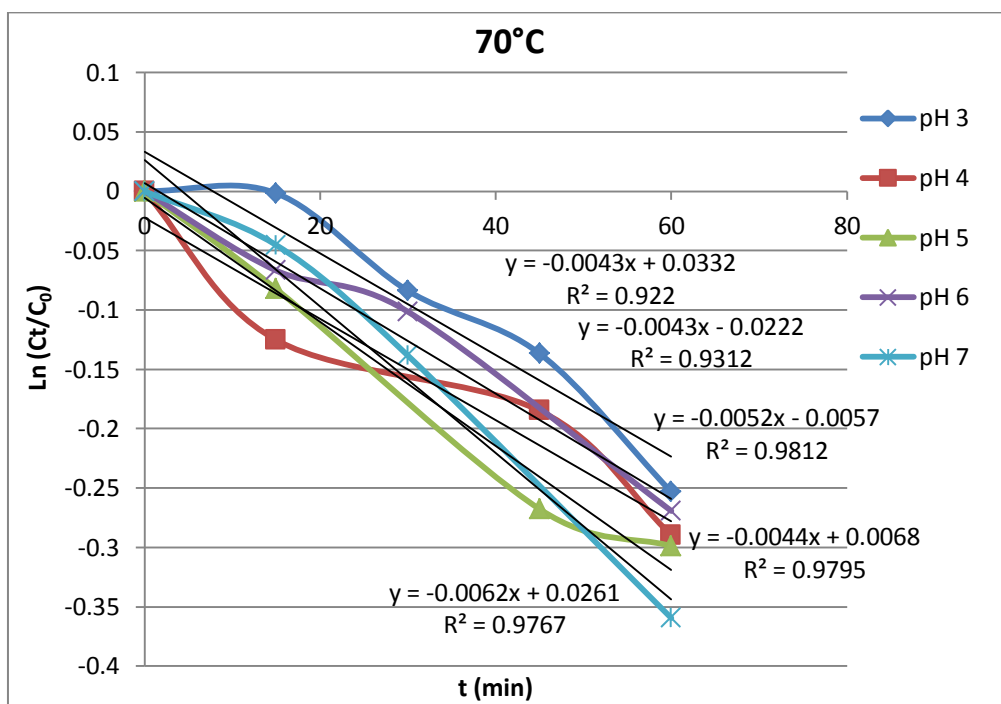


Figura 41. Gráfica del $\ln(C_t/C_0)$ contra el tiempo del rábano a pH de 3, 4, 5, 6 y 7 a 80°C.

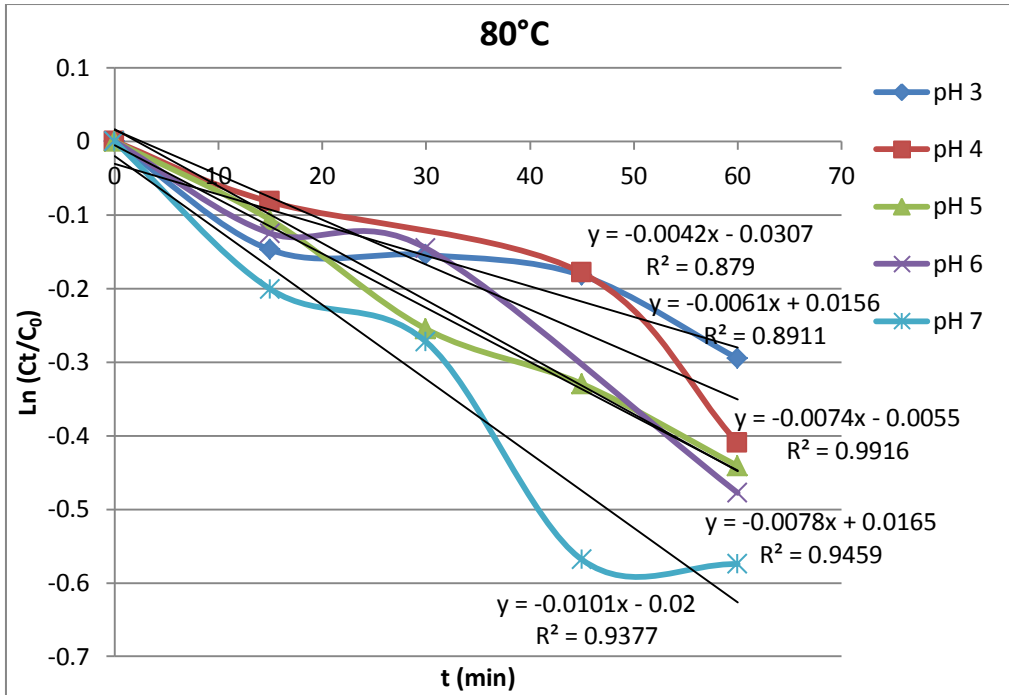


Figura 42. Gráfica del $\ln(C_t/C_0)$ contra el tiempo del rábano a pH de 3, 4, 5, 6 y 7 a 90°C.

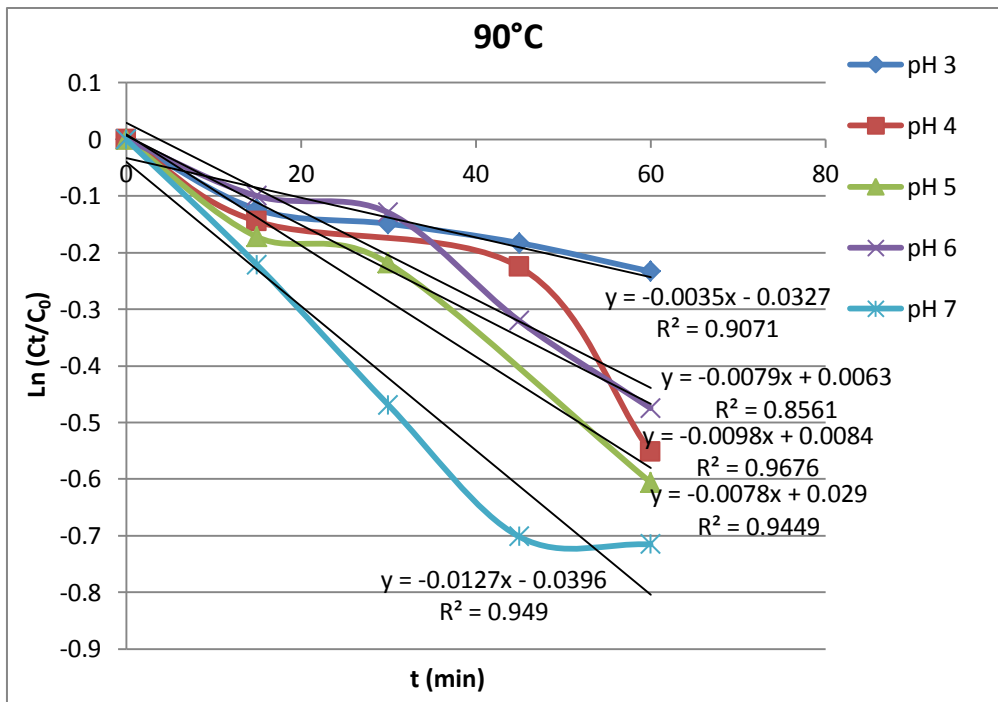
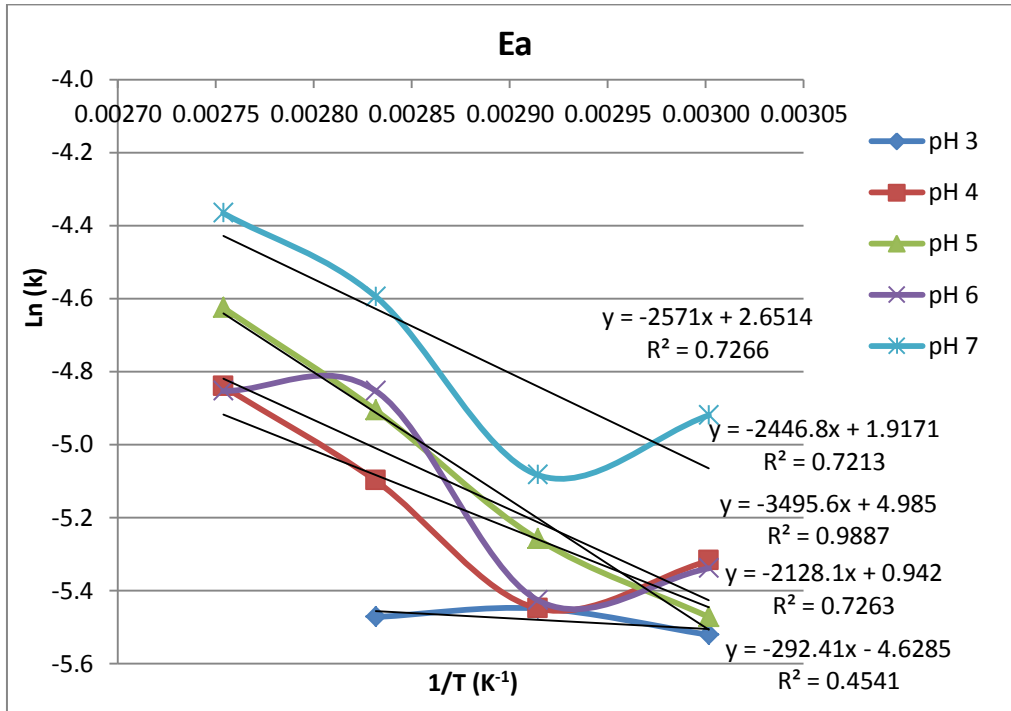


Figura 43. Gráfica del Ln (k) contra el inverso de la temperatura (K^{-1}) del rábano a pH de 3, 4, 5, 6.



CAMPANILLA

Figura 44. Gráfica del Ln (C_t/C_0) contra el tiempo de la campanilla a pH de 3, 4, 5, 6 y 7 a 60°C.

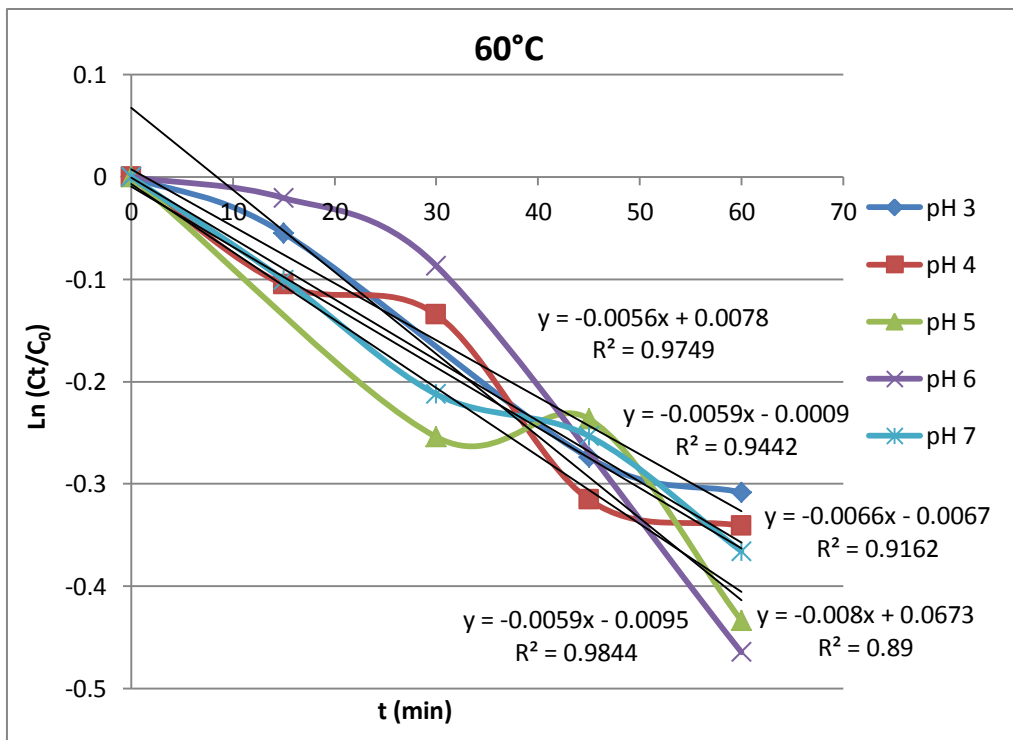


Figura 45. Gráfica del $\ln(C_t/C_0)$ contra el tiempo de la campanilla a pH de 3, 4, 5, 6 y 7 a 70°C.

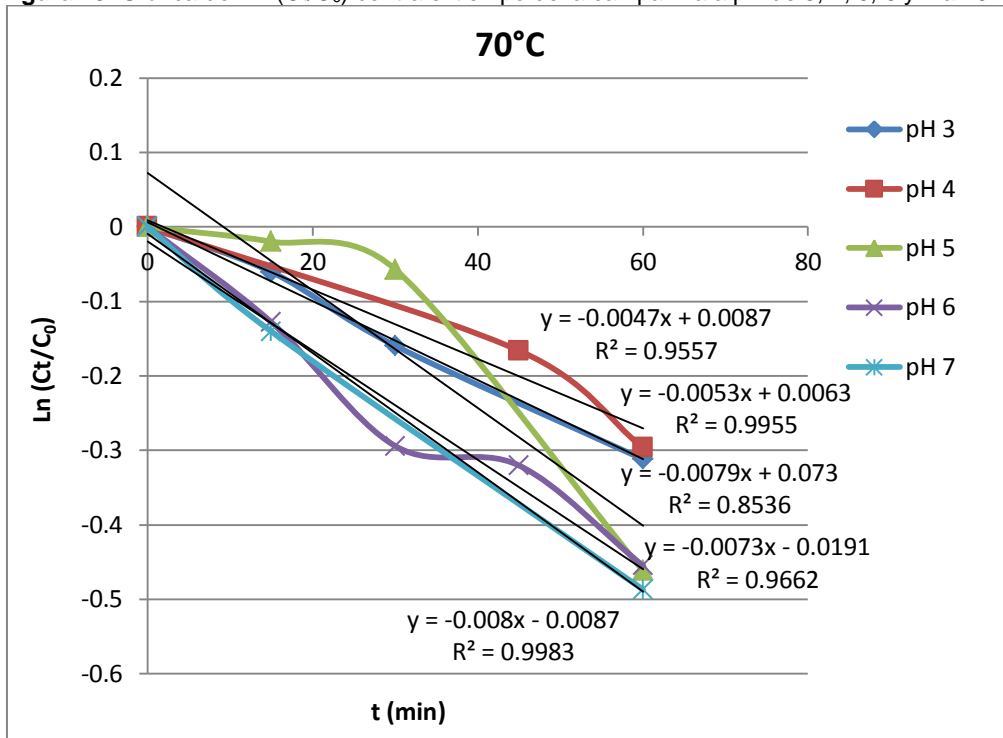


Figura 46. Gráfica del $\ln(C_t/C_0)$ contra el tiempo de la campanilla a pH de 3, 4, 5, 6 y 7 a 80°C.

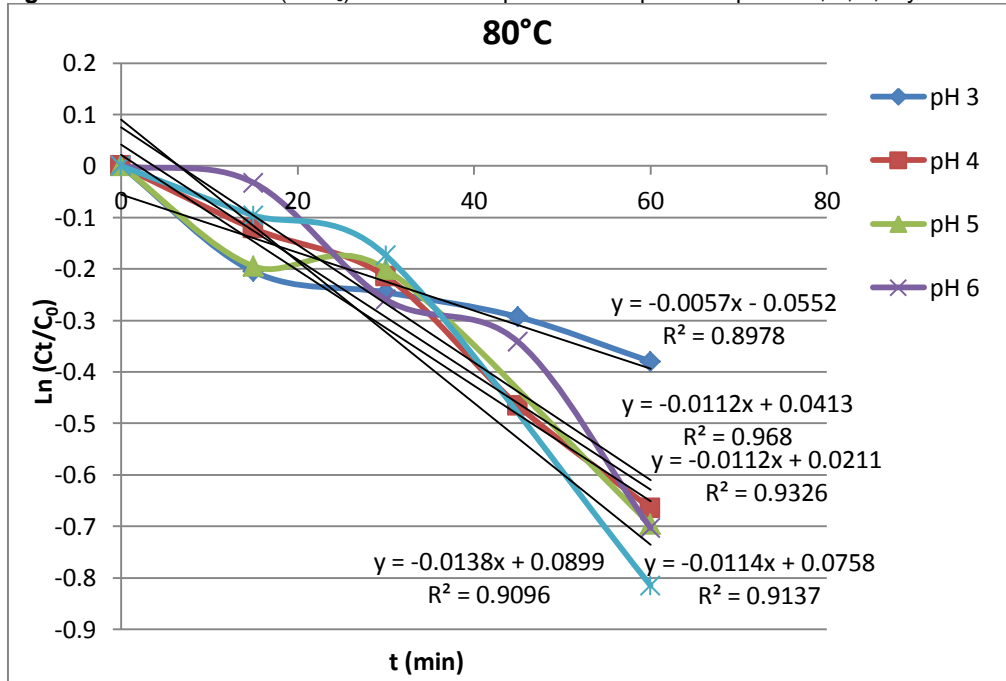


Figura 47. Gráfica del $\ln(C_t/C_0)$ contra el tiempo de la campanilla a pH de 3, 4, 5, 6 y 7 a 80°C.

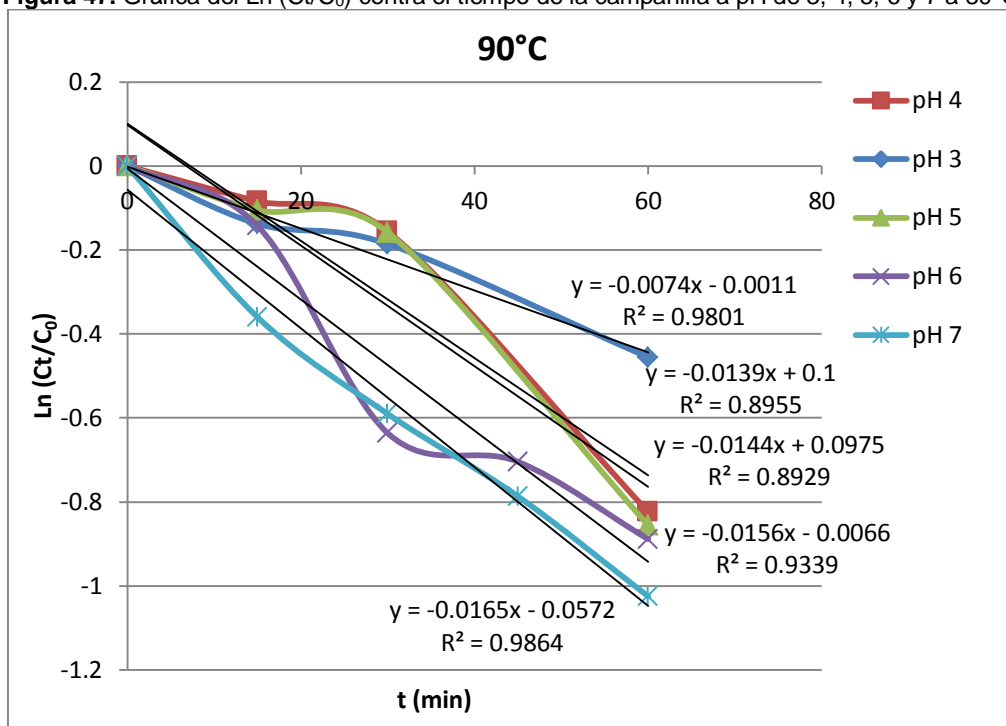
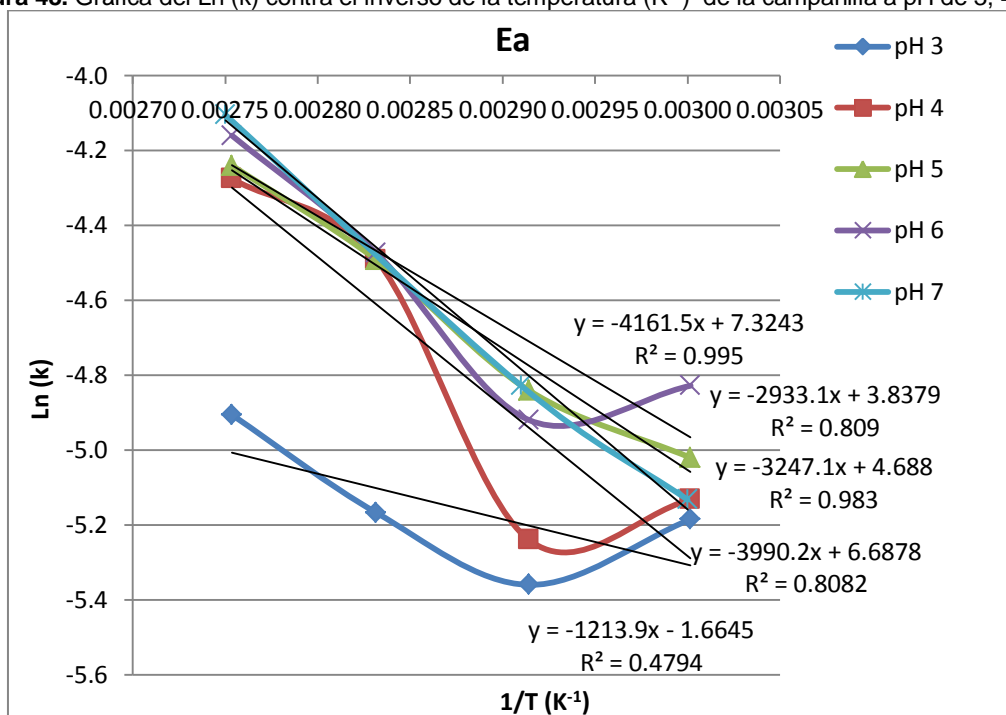


Figura 48. Gráfica del $\ln(k)$ contra el inverso de la temperatura (K^{-1}) de la campanilla a pH de 3, 4, 5, 6.



10.3 Valores numéricos de los atributos de color.

pH	L*		a*		b*		C*		h°	
	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final
60 °C										
3	88.238	88.600	19.489	19.050	3.819	3.648	19.848	19.396	10.788	10.824
4	93.453	93.573	6.48	5.987	0.935	0.911	6.547	6.073	8.209	9.669
5	95.009	95.055	2.221	2.129	0.76	0.673	2.354	2.234	15.400	17.581
6	95.062	95.277	1.431	1.365	0.79	0.735	1.639	1.55	29.29	28.308
7	95.158	95.276	1.242	1.295	0.808	0.629	1.483	1.441	32.003	26.053
70 °C										
3	88.608	88.812	19.470	19.047	3.419	3.292	19.773	19.5	10.130	10.380
4	93.157	93.639	7.325	6.137	0.914	0.873	7.382	6.213	7.124	8.927
5	94.342	94.537	2.825	2.357	0.735	0.674	2.914	2.426	13.931	12.126
6	95.066	94.902	1.331	1.210	0.867	0.940	1.688	1.628	33.092	29.027
7	95.118	95.048	1.282	1.194	0.863	0.985	1.546	1.503	34.001	39.378
80 °C										
3	88.238	89.468	19.823	16.841	3.785	3.925	20.848	17.141	10.788	10.642
4	93.284	93.756	6.839	5.687	0.962	0.979	6.906	5.765	8.020	9.416
5	94.783	95.087	2.265	2.027	0.606	0.703	2.392	2.146	17.986	19.221
6	95.148	95.418	1.602	1.295	0.629	0.762	1.798	1.503	27.083	30.523
7	95.250	95.317	1.184	1.012	0.801	1.184	1.431	1.459	33.983	46.147
90 °C										
3	88.590	89.159	19.075	17.702	3.530	3.688	19.399	17.878	10.481	10.624
4	93.325	93.772	6.877	5.704	0.940	1.011	6.941	5.792	7.798	10.094
5	94.794	95.174	1.598	1.363	0.725	0.764	1.811	1.433	28.728	20.787
6	95.140	95.422	1.290	1.165	0.825	0.906	1.532	1.432	32.557	32.550
7	95.186	95.245	1.242	1.037	0.754	1.438	1,453	1.776	31.158	54.321

Tabla 14. Valores numéricos de los atributos de color de las soluciones acuosas a diferentes valores de pH del extracto de rábano.

Tabla 15. Valores numéricos de los atributos de color de las soluciones acuosas a diferentes valores de pH del extracto de camote.

pH	L*		a*		b*		C*		h°	
	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final
60 °C										
3	93.202	93.349	6.870	6.594	-1.388	-1.265	7.008	6.714	348.578	349.138
4	93.067	93.902	3.865	3.435	-0.440	0.261	3.890	3.445	353.508	4.346
5	94.602	94.890	1.893	1.473	0.431	1.379	3.034	2.039	214.335	42.944
6	94.547	94.711	1.258	1.115	1.457	1.650	1.669	2.489	41.764	54.428
7	94.489	94.660	1.770	1.109	1.925	3.172	2.074	3.272	68.305	79.826
70 °C										
3	91.608	93.171	6.774	6.269	-1.042	-0.935	6.798	6.338	355.593	351.521
4	93.340	94.506	3.317	2.788	0.177	0.151	3.321	2.793	3.056	3.079
5	93.491	94.760	1.49	1.457	2.248	1.244	2.814	2.007	24.106	38.877
6	94.474	94.530	1.106	0.909	1.278	2.449	1.69	2.613	49.036	69.540
7	94.457	94.672	0.853	0.592	2.468	3.773	2.618	3.820	70.380	81.083
80 °C										
3	93.081	93.172	7.291	7.047	-1.559	-1.309	7.456	7.168	347.958	349.492
4	93.531	94.822	2.777	2.289	0.875	0.347	3.545	2.411	142.246	133.166
5	94.484	95.142	1.405	1.318	1.499	0.869	2.412	1.584	159.166	33.348
6	95.003	95.046	1.224	0.641	0.615	2.232	1.371	2.322	26.689	73.963
7	94.552	94.598	0.712	0.361	1.920	3.196	2.048	3.216	69.632	83.546
90 °C										
3	92.189	93.052	9.103	7.065	-1.654	-1.071	9.252	7.147	349.703	351.503
4	94.197	94.816	3.746	2.575	-0.466	0.048	3.775	2.578	352.914	121.466
5	94.612	95.220	2.026	1.071	0.022	1.027	2.030	1.490	120.597	44.153
6	94.611	94.917	1.304	0.544	1.031	2.637	1.663	2.697	38.282	78.169
7	94.345	93.873	0.777	0.502	1.898	3.690	2.051	3.725	67.772	81.999

Tabla 16. Valores numéricos de los atributos de color de las soluciones acuosas a diferentes valores de pH del extracto de campanilla roja.

<i>pH</i>	<i>L*</i>		<i>a*</i>		<i>b*</i>		<i>C*</i>		<i>h°</i>	
	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final
60 °C										
3	92.448	92.753	6.360	6.271	3.808	3.664	6.967	6.627	27.397	31.192
4	93.065	93.308	3.601	3.376	4.055	3.941	5.660	5.318	41.497	47.429
5	93.589	93.823	1.960	1.814	4.268	4.139	4.848	4.601	61.557	66.245
6	93.455	93.628	1.894	1.734	4.130	4.206	4.693	4.356	64.233	67.694
7	93.187	93.378	0.949	0.678	5.665	6.294	6.014	6.360	77.950	80.797
70 °C										
3	92.359	92.743	6.063	5.941	3.783	3.589	7.117	6.941	25.600	31.148
4	93.051	93.380	3.705	3.429	4.071	3.905	5.500	5.197	35.020	48.708
5	93.286	93.903	2.036	1.832	4.186	4.077	4.732	4.471	58.774	65.765
6	93.227	93.689	2.002	1.748	4.120	4.221	4.741	4.569	57.458	67.484
7	92.876	93.436	1.052	0.724	5.496	6.314	5.811	6.357	70.603	83.401
80 °C										
3	92.683	92.958	5.673	5.431	3.552	3.342	6.517	6.377	28.434	31.611
4	92.821	93.066	4.061	3.737	4.196	4.055	5.600	5.518	40.687	47.338
5	93.558	93.882	2.148	1.809	3.915	3.943	4.473	4.340	57.803	65.311
6	93.447	93.457	1.846	1.745	4.076	4.545	4.475	4.869	65.636	69.000
7	93.588	93.933	1.348	0.882	8.097	9.498	8.762	9.851	67.540	74.601
90 °C										
3	92.702	92.854	5.863	4.722	3.557	3.089	5.863	4.723	27.632	29.809
4	93.542	93.689	3.091	2.925	3.888	3.321	5.121	4.597	35.785	46.261
5	93.713	94.509	2.107	1.621	4.209	4.162	4.326	4.772	57.132	69.229
6	93.700	94.228	1.846	1.745	4.124	4.654	4.422	4.911	64.958	73.877
7	93.827	94.378	1.281	0.649	7.808	9.280	8.737	9.881	68.627	78.293