



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS ACILADAS DE
PLANTAS ENDÉMICAS DE MÉXICO (MAÍCES Y SALVIAS)

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.A. FERNÁNDEZ AULIS MARÍA FERNANDA

TUTOR
ARTURO NAVARRO OCAÑA
Facultad de Química, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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	Dr. Alfredo Ortega Hernández
Vocal	M. en C. Emma Maldonado Jiménez
Vocal	M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez
Vocal	Dra. Laura Patricia Álvarez Berber
Secretario	Dr. José Fausto Rivero Cruz

Este trabajo se realizó en el departamento de Alimentos y Biotecnología, laboratorio 321, edificio E, Facultad de Química, UNAM.

Se presentó en la modalidad oral en el XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 2013 y en la modalidad poster en el 7th International workshop on anthocyanins, 2013.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría (No de registro 273829).

Al apoyo económico de CONACYT 2012-CB180128.

Al apoyo económico del proyecto PAPIIT-IN223611.

Al Dr. Arturo Navarro Ocaña por permitirme formar parte de su grupo de investigación y por su orientación y apoyo para la realización de este trabajo.

Al jurado de esta tesis, Dr. Alfredo Ortega, M. en C. Emma Maldonado, Dra. Laura Patricia Alvarez Berber, M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez y Dr. Fausto Rivero Cruz, por su revisión para poder mejorar este trabajo y por sus valiosas aportaciones.

A todos mis compañeros de maestría, de clases y de laboratorio.

DEDICATORIA

A mi Dios que me acompaña y da fuerzas en todo momento y sobretodo me brinda su amor incondicional.

A mis padres, Ponciano y Laura, que sin su apoyo no hubiera sido posible lograr este proyecto.

A Ricardo por los consejos, apoyo y por ser mi compañero en esta etapa del camino.

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA	IV
INDICE DE CUADROS	VII
INDICE DE GRÁFICAS	VII
INDICE DE FIGURAS	VIII
ABREVIATURAS.....	IX
JUSTIFICACIÓN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MARCO TEÓRICO.....	3
1. Colorantes Naturales.....	3
2. Compuestos Fenólicos.....	4
3. Generalidades de Antocianinas.....	6
3.1. Estructura de antocianinas.....	6
3.2. Biosíntesis.....	8
3.3. Estabilidad de antocianinas.....	10
3.4. Función de antocianinas.....	11
3.5. Extracción, purificación y análisis de antocianinas	12
3.6. Caracterización de antocianinas	13
4. Generalidades del Maíz.....	13
4.1. Descripción general.....	13
4.2. Etapas de crecimiento del maíz	14
4.3. Antocianinas de maíz	15
5. Generalidades de Salvias.....	18
5.1. Definición y distribución.....	18
5.2. Composición química de salvias.....	18
5.3. Antocianinas en salvias	19
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVOS	24
Objetivo General	24
Objetivos Particulares	24
PARTE EXPERIMENTAL	25

1. Preparación de muestras	27
2. Método para la detección de antocianinas aciladas.....	29
3. Obtención de los principales estándares contenidos en la cebolla morada.....	31
4. Evaluación de las antocianinas de maíz del maíz morado de Ixtenco y del maíz cacahuacintle	32
5. Análisis de antocianinas de salvas de México	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
Método de identificación de antocianinas aciladas usando CCF y CLAR	35
Evaluación de nuevas fuentes de antocianinas	41
Obtención de los principales estándares: ciandina-3- <i>O</i> -glucósido y ciandina-3- <i>O</i> -(6''malonil)glucósido presentes en la cebolla morada	45
Antocianinas presentes en el maíz morado de Ixtenco y maíz cacahuacintle	48
Antocianinas de las salvas	56
CONCLUSIONES	71
ANEXOS	72
1. Antocianinas Totales	72
2. Fenoles Totales.....	73
REFERENCIAS.....	82

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Concentración y tipo de antocianinas encontradas en maíces coloridos	17
Cuadro 2. Antocianinas presentes en las flores de salvias estudiadas hasta el 2002. ³⁷	20
Cuadro 3. Información del origen de las muestras para la identificación de antocianinas aciladas	28
Cuadro 4. Información del origen de los maíces y salvias.....	29
Cuadro 5. Antocianinas mayoritarias en cada una de las muestras analizadas.....	30
Cuadro 6. Método de CLAR para antocianinas	30
Cuadro 7. Datos de recolección de los maíces.....	32
Cuadro 8. Método de CLAR para antocianinas de <i>Salvias</i>	34
Cuadro 9. Cromatogramas de las muestras vegetales analizadas	39
Cuadro 10. Rf's y tiempos de retención de los extractos de antocianinas analizados	40
Cuadro 11. Cromatogramas de las muestras analizadas	43
Cuadro 12. Antocianinas totales de fuentes vegetales analizadas.	44
Cuadro 13. ¹ H RMN de la cianidina-3-glucósido y cianidina-3-(6''-malonil)glucósido.....	46
Cuadro 14. ¹³ C RMN de la cianidina-3-glucósido y cianidina-3-(6''-malonil)glucósido.....	46
Cuadro 15. Valores de [M ⁺]y patrón de fragmentación de las antocianinas encontradas en el maíz morado de Ixtenco y el maíz cacahuacintle	48
Cuadro 16. Antocianinas totales (mg/g) del maíz morado en diferentes etapas de madurez	50
Cuadro 17. Antocianinas totales (mg/g) del maíz cacahuacintle en diferentes etapas de madurez.....	51
Cuadro 18. Cromatogramas del extracto de antocianinas presentes en el grano de maíz morado en diferentes etapas de maduración	53
Cuadro 19. Cromatogramas del extracto de antocianinas presentes en el olote de maíz morado en diferentes etapas de maduración	54
Cuadro 20. Cromatogramas del extracto de antocianinas presentes en el totomoxtle de maíz morado en diferentes etapas de maduración	55
Cuadro 21. Antocianinas totales y fenoles totales de salvias de México.....	56
Cuadro 22. Comparación de los métodos de CLAR utilizados para la <i>S. amarissima</i>	58
Cuadro 23. Cromatogramas del extracto de antocianinas de flores de salvias	59
Cuadro 24. Máximos de absorción de los espectros de UV-VIS de los extractos de salvias.....	60
Cuadro 25. Identificación de antocianinas de <i>S. lasiantha</i>	68
Cuadro 26. Identificación de antocianinas de <i>S. lineata</i>	69
Cuadro 27. Identificación de antocianinas de <i>S. purpurea</i> , <i>S. amarissima</i> y <i>S. mexicana</i>	70

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Curva de calibración de cianidina-3-glucósido	47
Gráfica 2. Curva de calibración de cianidina-3-(6''malonil)glucósido.....	47
Gráfica 3. Antocianinas totales y fenoles totales del maíz morado.....	50
Gráfica 4. Antocianinas totales y fenoles totales del maíz cacahuacintle	51
Gráfica 5. Cuantificación de la C3G y C36G en el grano, olote y totomoxtle del maíz morado.....	52
Gráfica 6. Cuantificación de la C3G y C36G en olote y totomoxtle de maíz cacahuacintle	52
Gráfica 7. Curva patrón para fenoles totales	73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de polifenoles. ⁷⁴	5
Figura 2. Ejemplos de polifenoles libre, sulfatado y glucosilado	5
Figura 3 . Antocianidinas principales.....	6
Figura 4. Efecto de los sustituyentes en la coloración de las antocianinas	7
Figura 5. Biosíntesis de antocianinas	9
Figura 6. Estructuras de antocianinas en medio acuoso a diferentes pHs	10
Figura 7. Variedad de maíces encontrados en México ⁷⁵	13
Figura 8. Ciclo de crecimiento del maíz. ⁷⁶	14
Figura 9. Variedad de maíces en Tlaxcala.....	15
Figura 10. Morfología básica del maíz. ⁷⁷	15
Figura 11. A. Esquema del grano de maíz. ⁷⁸ B. Microscopia del grano de maíz en el cual se observa el color rojo en el pericarpio. ⁷⁹	16
Figura 12. Antocianinas aciladas de especies de salvias	21
Figura 13. Complejo antocianina, apigenina y Mg ²⁺ . ⁴⁰	22
Figura 14. Diagrama de la parte experimental.....	26
Figura 15. <i>S. lineata</i> secada a 45°C durante 72 horas	27
Figura 16. Cromatograma del extracto de cebolla morada	31
Figura 17. Esquema general del análisis de antocianinas del maíz morado de Ixtenco y del maíz cacahuacintle	32
Figura 18. Esquema general del análisis de antocianinas de las flores de salvias	33
Figura 19. CCF del extracto de antocianinas de muestras conocidas (Placa de silica gel, eluyente: Butanol:ác. acético:agua 3:1:2).	36
Figura 20. CCF de plantas analizadas (Placa de silica gel, eluyente: Butanol:ác. acético:agua 3:1:2).	41
Figura 21. Estructura de la C3G y C36G.....	45
Figura 22. Espectro de masas (EM-ESI+; inyección directa) del extracto de olote del maíz morado	49
Figura 23. Maíz cacahuacintle	51
Figura 24. Cromatografía en capa fina de antocianinas de flores de salvias (Placa de silica gel, eluyente: Butanol:ác. acético:agua 3:1:2).....	57
Figura 25. Cromatograma del extracto de las flores de <i>S. fulgens</i>	61
Figura 26. Cromatogramas de las antocianinas presentes en las flores de la <i>S. fulgens</i> de antocianinas hidrolizadas A) Muestra sin hidrolizar y B) Muestra hidrilizada	61
Figura 27. Estructura propuesta, espectro de UV y espectro de MS/MS de la antocianina que eluye en 7.8 min, identificada como pelargonidina-3,5- <i>O</i> -diglucósido.....	62
Figura 28. Espectro UV-VIS pico correspondiente al minuto 16.95 y 19.01	62
Figura 29. Espectro de MS ² y MS ³ para los compuestos eluidos en 16.95 y 19.01 min.....	63
Figura 30. Estructura propuesta, espectro de UV-VIS y espectros de MS ² obtenidos para la antocianina eluida a 15.8 min	64
Figura 31. Espectros UV-VIS para las antocianinas aciladas presentes en la muestra no hidrolizada, en la cual se observan solo dos tipos de espectros de las 6 antocianinas analizadas	65
Figura 32. Espectros MS ² y MS ³ de <i>S. fulgens</i>	65
Figura 33. Derivados de la pelargonidina-3- <i>O</i> -(6''- <i>p</i> -cumaroilglucósido)-5-glucósido y pelargonidina-3- <i>O</i> -(6''- <i>p</i> -cafeoilglucósido)-5-glucósido	66

Figura 34. Espectros MS ² y MS ³ de <i>S. fulgens</i>	67
Figura 35. Cromatogramas de la <i>S. lasiantha</i> sin hidrolizar e hidrolizada.	68
Figura 36. Estructura de la cianidina-3- <i>O</i> -(6'' <i>p</i> -cumaroilglucosil)-5-glucósido	68
Figura 37. Antocianinas encontradas en la <i>S. lineata</i>	69
Figura 38. Propuesta de la antocianina mayoritaria de la <i>S. mexicana</i>	70
Figura 39. Efecto del pH en las antocianinas	72

ABREVIATURAS

Antocianinas Totales	AT
Ácido acético	AcOH
Ácido clorhídrico	HCl
Ácido trifluoroacético deuterado	CF ₃ COOD
Cianidina-3-glucósido	C3G
Cianidina-3-rutinósido	C3R
Cianidina-3(6''-malónil)-glucósido	C36G
Constante de acoplamiento	<i>J</i>
Cromatografía en capa fina	CCF
Cromatografía en columna	CC
Cromatografía de líquidos de alta resolución	HPLC
Delfinidina-3-glucósido	D3G
Delfinidina-3-rutinósido	D3R
Desplazamiento químico	δ
Doblete	<i>d</i>
Doble de dobles	<i>dd</i>
Factor de retención	R _f
Partes por millón	ppm
Pelargonidina-3-glucósido	P3G
Peonidina-3-glucósido	Pn3G
Petunidina-3-glucósido	Pt3G
Malvidina-3-glucósido	M3G
Megahertz	MHz
Metanol	MeOH
Metanol deuterado	CD ₃ OD
Relación masa/carga	m/z
Singulete	<i>s</i>
Espectrometría de masas	EM

JUSTIFICACIÓN

El color y la apariencia son quizá los atributos de calidad más importantes de los alimentos, estas características son las primeras que serán evaluadas por el consumidor ya que están relacionadas con el sabor y frescura del alimento.¹ Tal es la importancia de estas propiedades que aun los alimentos más nutritivos, sanos y económicos, si no son atractivos, no se favorecerá su venta. Esta es la razón por la cual los colorantes son de gran importancia en la industria de alimentos. Los colorantes utilizados en esta industria, son principalmente de origen sintético y su uso se ha restringido en los últimos años debido a su toxicidad.

Las antocianinas son colorantes naturales que han cobrado gran importancia en los últimos años en las comunidades científicas e industriales porque, además de su color, son benéficas para la salud humana, por su capacidad antioxidante. Estos colorantes se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales, flores y frutos produciendo en ellos distintos colores como rojo, azul, morado y negro; sin embargo, el problema es su inestabilidad frente a diversos factores como luz, pH y temperatura. No obstante, se ha reportado² que existen antocianinas altamente aciladas con mayor estabilidad frente a los factores mencionados anteriormente, pero las fuentes de donde se pueden obtener son limitadas.

Se sabe que algunos maíces³ y diferentes especies de salvias deben su coloración a la presencia de antocianinas aciladas.⁴ Estos materiales son una fuente potencial de colorantes naturales para la industria de alimentos, sin embargo, los reportes de aislamiento y caracterización son limitados. Debido a la falta de estudios que proporcionen información sobre la presencia, estructura y caracterización de antocianina aciladas de maíces⁵ (especialmente maíz morado) y salvias se ha decidido llevar a cabo esta investigación.

INTRODUCCIÓN

México es un país que cuenta con una gran variedad de recursos naturales en todo su territorio, ocupa el cuarto lugar en biodiversidad del mundo con 26 000 especies vegetales entre ellas los maíces y las salvias. Así mismo, México es considerado el centro de origen del maíz, razón por la cual cuenta con una gran variedad de esta gramínea. Estos maíces están distribuidos a lo largo y ancho del territorio mexicano lo que demuestra su adaptabilidad a diversas condiciones climatológicas y geográficas. En cada región agrícola existen variedades de maíz adaptadas y todas ellas están relacionadas con algunas de las más de 50 razas que han sido descritas para México.⁶ Como consecuencia de esta diversidad existen maíces de diferentes tamaños, formas y colores, así encontramos maíces con grano de color blanco, amarillo, rosa, rojo, morado, azul y negro, la coloración también se presenta en diferentes órganos de la planta como son el tallo, las hojas, el olote, y las brácteas llamadas comúnmente totomoxtle, que son las hojas que cubren el fruto.⁷ Otra muestra de diversidad se puede observar en el género *Salvia*, con aproximadamente 300 especies en México, de las cuales entre el 85-88% son endémicas, éstas presentan diferentes formas de crecimiento incluyendo hierbas anuales y perennes, arbustos y raramente arbustos trepadores; además el 76.5% de las especies presentan flores azules o moradas.⁸

De acuerdo a lo reportado,^{6,9} la coloración de los maíces y salvias es debida a la presencia de antocianinas aciladas. Sin embargo, se han estudiado poco las antocianinas presentes en los maíces coloridos nativos de México y no hay reportes de las antocianinas presentes en salvias que crecen en este país. Las antocianinas son el grupo más grande de pigmentos hidrosolubles y el contenido de diferentes tipos de antocianinas es el responsable de la gran variedad de colores que presentan estos materiales. Las antocianinas son colorantes inocuos, de fácil incorporación en un medio acuoso y son una alternativa para la sustitución de los colorantes sintéticos. Salinas¹⁰ reportó en el 2005 el potencial que tienen las antocianinas presentes en el grano de maíz morado como colorantes naturales en yogurt natural comercial. Un mayor conocimiento en la composición de antocianinas en los maíces y salvias analizados puede conducir al descubrimiento de nuevas fuentes de colorantes naturales de mayor estabilidad que los utilizados actualmente.

MARCO TEÓRICO

1. Colorantes Naturales

Un colorante es cualquier sustancia química natural o sintética que confiera color al medio que lo contenga, los colorantes sintéticos son ampliamente usados ya que poseen una mayor uniformidad, poder de tinción y estabilidad; sin embargo, algunos son causantes de enfermedades crónicas, lo cual ha provocado un interés a nivel mundial en los colorantes naturales. Los consumidores se preocupan cada vez más por los productos que adquieren y como consecuencia, los gobiernos establecen cada vez más restricciones acerca del uso de los colorantes sintéticos.

El uso de biocolorantes muestra mayores ventajas frente a los colorantes sintéticos, ya que la mayoría de ellos son menos tóxicos, algunos son solubles en agua, como es el caso de las antocianinas, lo cual facilita su incorporación en sistemas acuosos y son amigables con el medio ambiente. A pesar de estas ventajas, presentan ciertas limitaciones tal como su baja estabilidad, bajo poder de tinción y alto costo de extracción. No obstante, la estabilidad puede ser mejorada por el uso de ciertos aditivos como las dextrinas y maltodextrinas, también se ha demostrado que el aumento en la glicosilación y la acilación incrementa considerablemente su estabilidad.¹¹ Así, el uso de antocianinas aciladas podría ser una alternativa al uso de colorantes sintéticos en productos alimenticios tales como bebidas, confitería, panadería, en helados, gelatinas, mermeladas y leches saborizadas.¹²

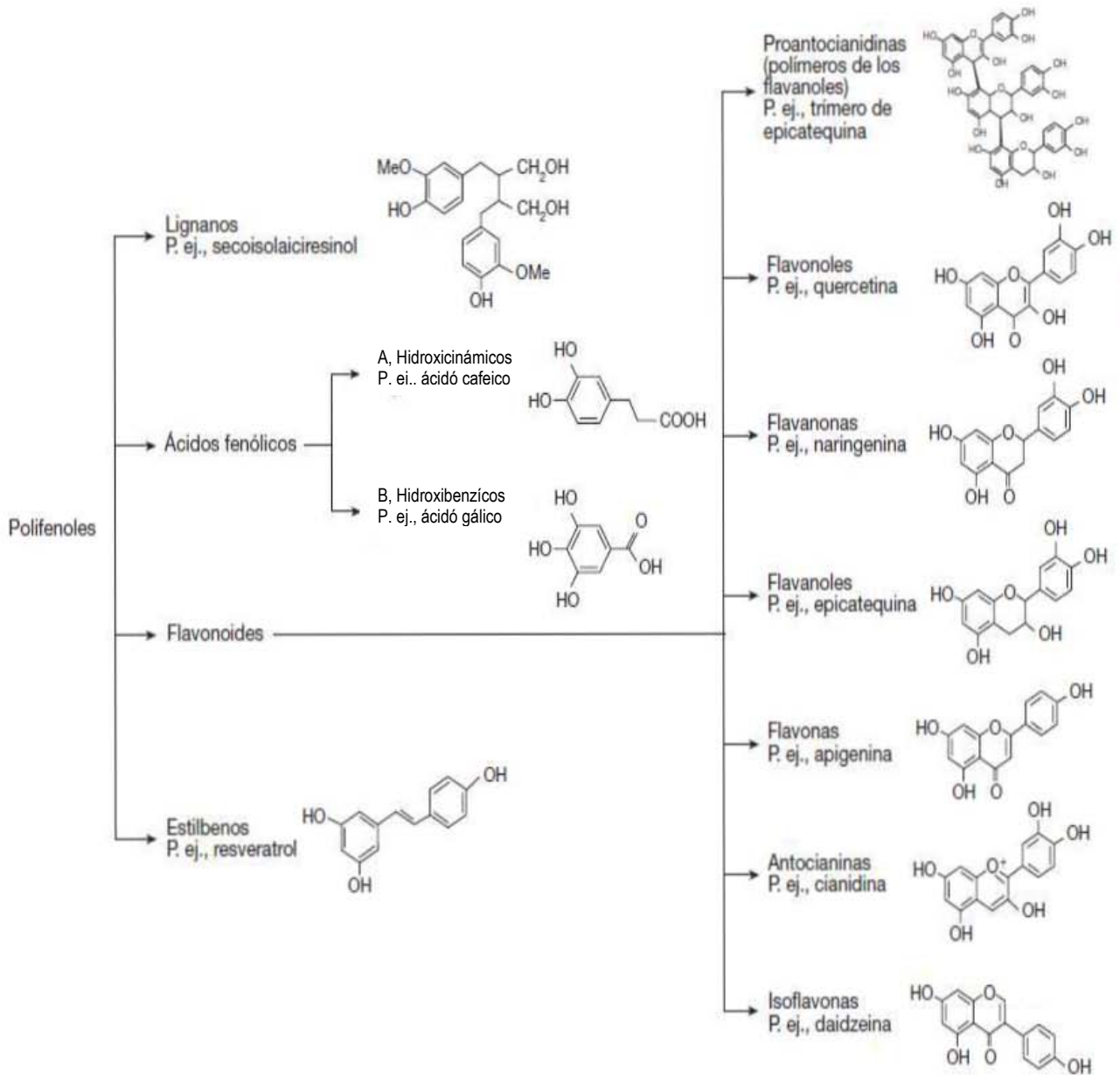
Hoy en día ya se obtienen antocianinas termoestables a partir de la col morada, la cual contiene quince antocianinas, la mayoría derivadas de la cianinina-3,5-O-diglucósido, acilada con ácido ferúlico, cinámico y/o *p*-cumárico, que aunque tienen un alto costo, este es compensado por su alta estabilidad.¹²

2. Compuestos Fenólicos

Las plantas contienen una serie de sustancias que intervienen en el metabolismo secundario y cuya función es variada como ejemplo se encuentran los reguladores de crecimiento, protectores naturales frente a parásitos y/o depredadores.¹³ En este grupo se encuentran los polifenoles que son un conjunto heterogéneo de compuestos con una gran capacidad antioxidante y que están distribuidos ampliamente en la naturaleza. Estos polifenoles están compuestos por uno o más anillos aromáticos con un número variable de grupos hidroxilo; se han caracterizado cerca de 10 000, algunos son solubles en disolventes orgánicos, otros son solubles en agua y otros son polímeros insolubles. Se pueden clasificar de acuerdo al número de anillos aromáticos y de los elementos estructurales que los conforman en: 1) fenoles simples o ácidos fenólicos, entre ellos se encuentran los ácidos benzoicos (C6-C1), acetofenonas (C6-C2) y ácidos hidroxicinámicos (C6-C3), 2) estilbenos (C6-C2-C6), 3) lignanos (C6-C3)₂ y 4) flavonoides (C6-C3-C6) (Figura 1). Se han aislado más de 4 000 flavonoides y se han ordenado de acuerdo a las variantes estructurales que presenta su estructura general entre ellas se encuentran flavonas, isoflavonas, flavonoles y antocianinas.¹⁴

Las propiedades físicas de los polifenoles dependen de la clase de flavonoide considerado y si está en forma libre, glicósido o sulfato (Figura 2). Existe un interés especial en los flavonoides debido a su actividad antioxidante y a que reducen la concentración de radicales libres y en algunos casos quelatan a iones metálicos. Algunos polifenoles presentan actividad como agentes mutagénicos, estimulan la actividad de la enzima fenolsulfotransferasa implicada en la desintoxicación de compuestos metabólicos potencialmente tóxicos y poseen actividad bactericida, también presentan propiedades antimicrobianas, antitumorales, antitrombosis e inhiben la tendencia a la peroxidación. Uno de los mecanismos involucrados en la actividad antioxidante, establece la donación de electrones o átomos de hidrógeno a los radicales libres.¹⁵

MARCO TEÓRICO



5

Figura 1. Clasificación de polifenoles. ⁷⁶

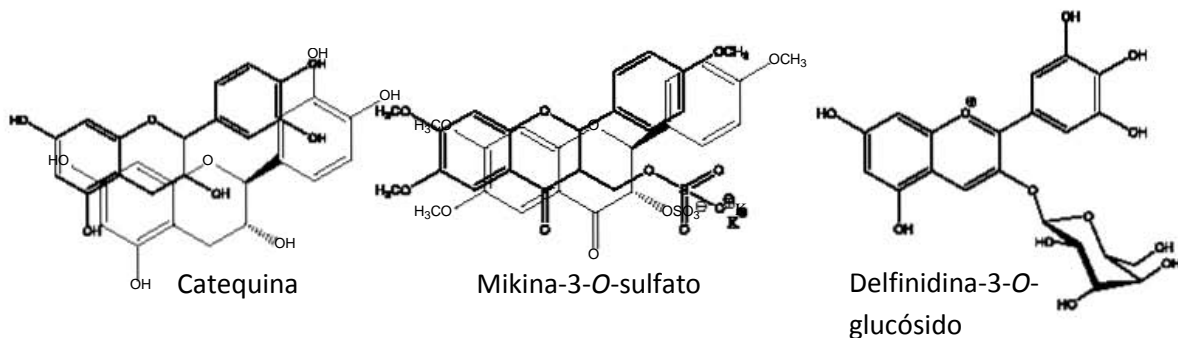


Figura 2. Ejemplos de polifenoles libre, sulfatado y glucosilado

3. Generalidades de Antocianinas

Las antocianinas constituyen el primordial grupo de flavonoides responsables de la coloración de frutos, flores y hojas. Su coloración puede ser rosa, morada, azul, naranja o negra, dependiendo de diferentes factores como la concentración, el pH y de su interacción con otros pigmentos. El tipo de antocianinas depende de la fuente de la que se obtengan. El interés que actualmente se tiene por estos compuestos ha hecho necesario encontrar un método eficiente para su extracción y cuantificación.

En la naturaleza se producen 10⁹ toneladas de antocianinas. Una de las mejores fuentes para su extracción es la uva, debido a que las antocianinas que contiene presentan complejos fenólicos brindándoles así mayor estabilidad.¹⁶ Sin embargo, existe una larga lista de otras fuentes de interés que actualmente son estudiadas tales como: berenjena, arándano, arándano agrio, frambuesa, zarzamora, maíz colorado, cebolla morada, col morada, durazno, granada, higo, jamaica, jitomate, cereza, camote, fresa, zanahoria, entre otros.¹⁷ En 2003 Giusti² observó que la estabilidad de las antocianinas es mayor al aumentar el grado de acilación como las que se encuentran en el camote, el rábano y la zanahoria morada.

3.1. Estructura de antocianinas

Se ha identificado una gran variedad de antocianinas con propiedades diferentes, una de ellas, el color, que depende de la presencia de diferentes sustituyentes en la estructura principal. Se conocen 539 antocianinas aisladas hasta el año 2006¹⁸ y se continúan dando a conocer nuevas antocianinas cada año. Las antocianinas están compuestas por una estructura base (antocianidina) y una unidad glicosídica. La estructura básica (antocianidina) tiene un esqueleto C6-C3-C6, formado por un anillo aromático (A) y un heterociclo (C), unidos por un enlace carbono-carbono con un tercer anillo aromático (B), esta estructura es conocida como 2-fenilbenzopirilio o también llamado sal de flavilio (Figura 3).

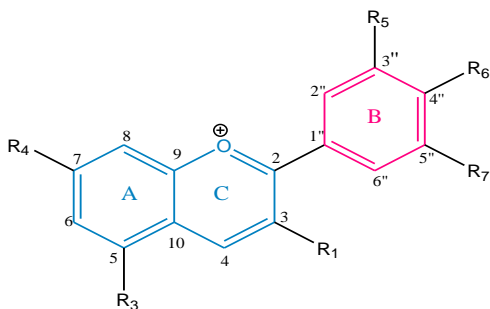


Figura 3 . Antocianidinas principales

Nombre	Patrón de Sustitución	Patrón de Sustitución						
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
Cianidina	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
Delfinidina	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
Malvidina	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe
Peonidina	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H
Pelargonidina	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H
Petunidina	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH

MARCO TEÓRICO

Las antocianinas se diferencian entre sí por el número de sustituyentes hidroxilo y/o metoxilo, y el tipo de azúcares, ácidos alifáticos o aromáticos que están unidos a ellas.¹ Las antocianidinas (núcleo base) más comunes en la naturaleza son: cianidina (Ci), delphinidina (Df), malvidina (Mv), peonidina (Pn), pelargonidina (Pg), y petunidina (Pt), de estas las más abundantes son las tres no metiladas (Ci, Df y Pg).¹⁹

Los azúcares más comunes en las antocianinas son: glucosa, ramnosa, galactosa y arabinosa generalmente están unidos en la posición 3 del flavonoide, y menos frecuente en las posiciones 3,5- y 3,7-. Además de la glicosilación, la presencia de grupos acilo es común. Los ácidos más frecuentes implicados en la acilación de azúcares son ácidos aromáticos como *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico y raramente el hidroxibenzoico¹⁵; los ácidos alifáticos más comunes son el malónico, acético, málico, succínico y oxálico. Estos sustituyentes acilo esterifican generalmente al grupo -OH la posición 6 del azúcar, aunque se han hallado patrones de acilación más complejos.¹

La variedad de colores que presentan las antocianinas depende de los sustituyentes de la molécula, cuando la estructura presenta más sustituyentes hidroxilo (OH) el color tiende al azul y cuando presentará más sustituyentes metoxilo (CH₃O) el color tiende al rojo-naranja (Figura 4).

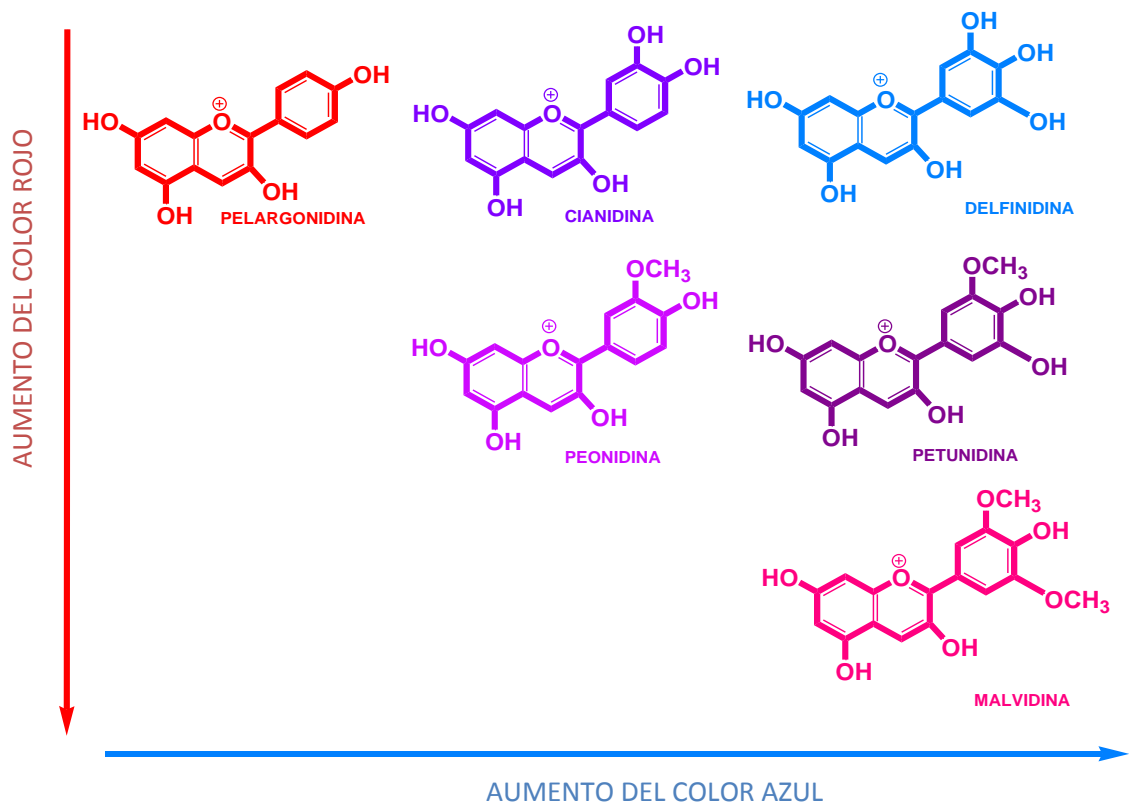


Figura 4. Efecto de los sustituyentes en la coloración de las antocianinas

3.2. Biosíntesis

La síntesis de antocianinas se lleva a cabo por medio de dos rutas metabólicas: 1) la del ácido shikímico y 2) la del acetato-malonato, y las moléculas precursoras son: malonilCoA y *p*-cumaril-CoA como se observa en la Figura 5.

La principal reacción de biosíntesis es la condensación de los acilos provenientes de cumaril-CoA y tres moléculas de malonil-CoA catalizada por la enzima chalcona isomerasa que lleva a cabo la isomerización de chalcona a flavona, misma que es convertida en antocianinas. Los pasos finales en la síntesis de antocianinas son las acilaciones y las glicosilaciones, en primer lugar en el C-3 para estabilizar el catión flavilio.¹⁵

Las antocianinas son sintetizadas en el citoplasma cerca del retículo endoplásmico; el citoplasma se encuentra a un pH de 7 donde las antocianinas se encuentran en forma de pseudobase sin coloración alguna o ligeramente azules (base quinoidal). Después de ser sintetizadas, las antocianinas son transportadas hacia la vacuola donde el pH es generalmente de 4.5 a 5.5 donde las antocianinas se tornan de color rojo.²⁰

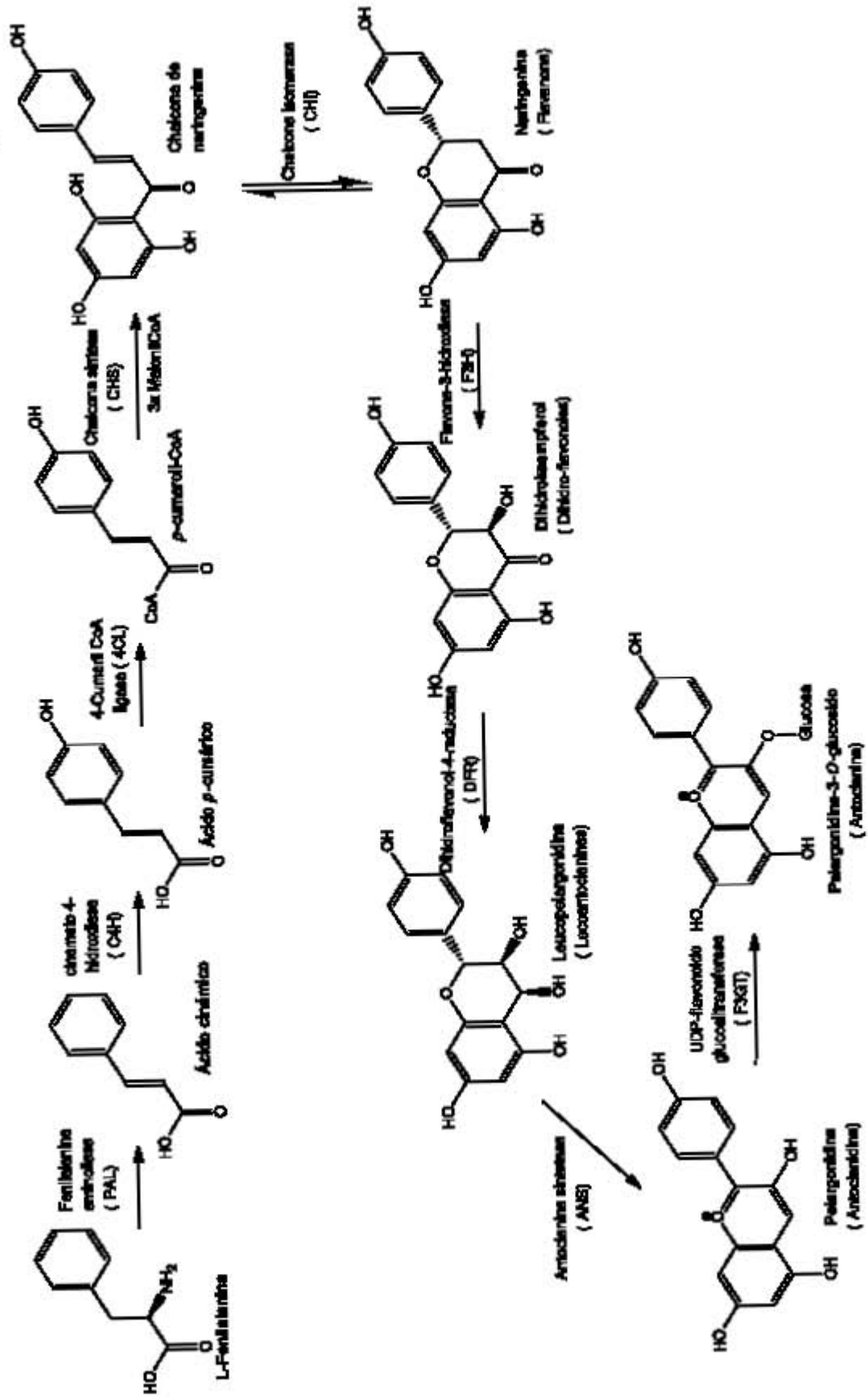


Figura 5. Biosíntesis de antocianinas

3.3. Estabilidad de antocianinas

Las antocianinas son inestables y muy susceptibles a la degradación. Su estabilidad es afectada por diversos factores como estructura química, pH, temperatura, concentración, luz, oxígeno, enzimas, flavonoides, proteínas y iones metálicos.¹⁹

Estructura química. Algunas antocianinas son más estables que otras. En general, el aumento en el número de sustituyentes hidroxilo disminuye la estabilidad, mientras que el aumento en el número de sustituyentes metoxilo aumenta la estabilidad. Por otra parte, el aumento en el grado de glicosilación y acilación aumenta la estabilidad.¹ Las antocianinas que contienen ácido cinámico son capaces de isomerizar de *trans* a *cis* el ester cinámico, lo que provoca una intensificación del color y una mayor resistencia a la hidratación del núcleo.¹²

El pH. Este es uno de los factores más importantes en la estabilización o degradación de las antocianinas. En solución acuosa las antocianinas pueden existir en cuatro posibles formas estructurales: A pH 1 el catión flavilio es la especie predominante con coloración roja. Entre pH 2-4 la base quinoidal es de color azul, a valores entre 5-6 la especie es incolora y a valores mayores de pH 7 las antocianinas se degradan dando como resultado una coloración amarilla que corresponde a la formación de la chalcona. (Figura 6)

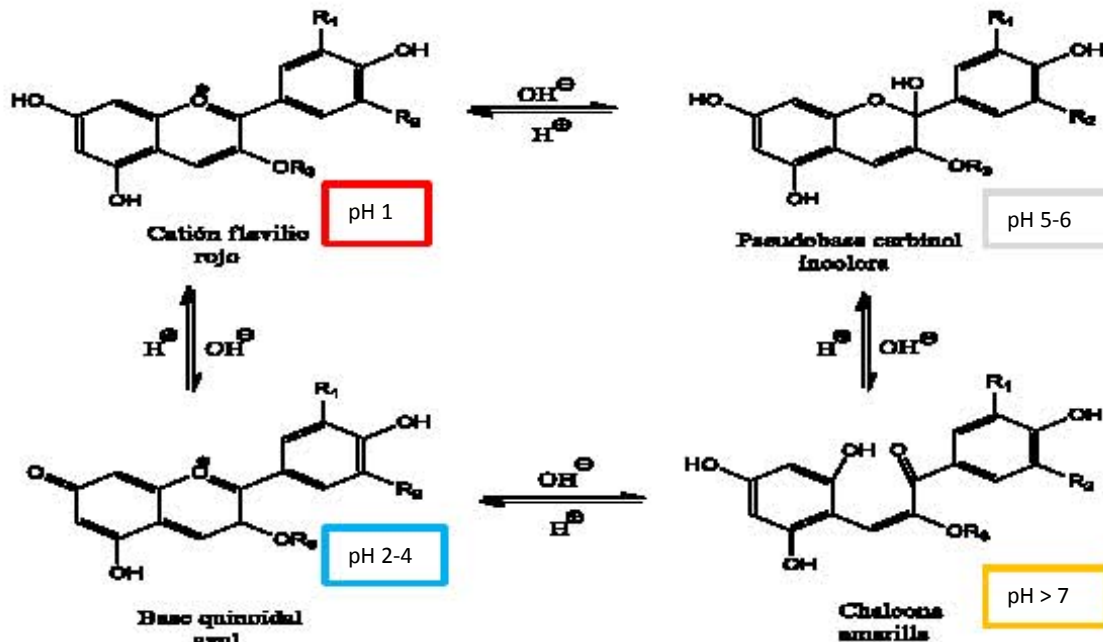


Figura 6. Estructuras de antocianinas en medio acuoso a diferentes pHs

Temperatura. En general, los grupos que tienden a aumentar la estabilidad frente al pH también conducen a un aumento en la estabilidad térmica. Las antocianidinas con un elevado grado de hidroxilación son menos estables que las antocianidinas metiladas, glicosiladas o aciladas.¹

Acilación. La acilación de antocianinas se da generalmente en el residuo glicosídico y los grupos acilos pueden ser alifáticos y/o aromáticos. Estos se encuentran unidos generalmente al oxígeno presente en el carbono 6 del azúcar. Cevallos en 2004,²¹ mostró que las antocianinas aciladas con ácidos aromáticos hidroxilados eran más estables al procesamiento y almacenamiento, además el aumento en la estabilidad se atribuye a que las moléculas se van apilando alternadamente, reduciendo así la susceptibilidad de un ataque nucleofílico del agua y la subsecuente formación de la pseudobase o chalcona.²²

Metales. La formación de complejos de iones metálicos con antocianinas

3.4. Función de antocianinas

La función de las antocianinas en los diferentes órganos de los vegetales no está bien definida, sin embargo, existen diferentes hipótesis de sus funciones como son: (1) protección de los cloroplastos por exposición prolongada a la luz, (2) atenuación de la radiación UV-B y (3) actividad antioxidante.²³ De manera general, las funciones mencionadas son consecuencia de factores que representan estrés para la planta como un exceso de luz, radiación UV, temperaturas extremas, deficiencias de nutrientes, sequía, infecciones bacterianas o por hongos. Por lo tanto, se ha considerado que las antocianinas son una respuesta al estrés o parte de un mecanismo que disminuye sus efectos.

Durante la fotosíntesis es necesaria la luz, sin embargo, un exceso de ésta puede desencadenar reacciones indeseables produciendo especies reactivas de oxígeno como O_2^{\cdot} , H_2O_2 y OH^{\cdot} , dañando las membranas causando degradación de los cloroplastos, a esto se le conoce como estrés oxidativo, el cual es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de la planta para protegerse. La presencia de antocianinas reduce el daño a los cloroplastos,²⁴ aunque el proceso aún no está completamente claro, se han realizado estudios donde demuestran la capacidad fotoprotectora de las antocianinas frente a un exceso de luz.²⁵ También, las antocianinas funcionan para la atracción de polinizadores, para alejar herbívoros y parásitos ya que para estos el color rojo indica toxicidad.

En los humanos las antocianinas actúan como antioxidantes por su capacidad para reaccionar con los radicales libres. Diversos estudios han demostrado que hay una relación entre el contenido de antocianinas en la dieta y un efecto protector contra enfermedades crónicas degenerativas, estas actúan como inhibidores de carcinogénesis y mutagénesis, y esto se atribuye a su capacidad antioxidante que es mayor que la que presenta la vitamina C y E.¹⁹

3.5. Extracción, purificación y análisis de antocianinas

Las antocianinas se han extraído utilizando disolventes como etanol o metanol con una pequeña cantidad de ácido (clorhídrico, fórmico y acético, entre otros) con el propósito de formar el catión flavilio, mismo que en condiciones ácidas se estabiliza y previene la degradación de antocianinas. También se han utilizado diferentes métodos de extracción como son el uso microondas, ultrasonido, enzimas y dióxido de carbono CO₂. Para la purificación de antocianinas se ha utilizado la cromatografía, en donde la polivinilpirrolidona (PVP), octadecilsilano (ODS), Sephadex G-25, Sephadex LH-20, poliamida, resinas de intercambio iónico, alúmina ácida son usadas como fases estacionarias,²⁶ también se ha utilizado la extracción en fase sólida y electroforesis.¹⁹ La técnica más utilizada actualmente es la extracción en fase sólida, SPE, por sus siglas en inglés (Solid Phase Extraction). esta técnica es la más fácil en la cual se usan cartuchos de C18 y Sephadex.

Para la separación de antocianinas a gran escala la cromatografía en columna abierta ha resultado una opción, sin embargo, ninguna fase estacionaria ha mostrado tener una alta resolución y adecuada retención, por ejemplo, la silica gel muestra una buena resolución, es decir, hay una separación completa de las diferentes antocianinas, pero la retención es muy fuerte y no es posible recuperar las antocianinas, por el contrario, la celulosa no tiene buena resolución, no obstante se logran recuperar la mayor cantidad de antocianinas.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es una técnica utilizada en el análisis de antocianinas, en la que se emplean diferentes metodologías y los detectores más usados son el UV-VIS y el de fotodiodos.¹⁹ La CLAR tiene como ventaja cortos tiempos de separación y una alta resolución.

3.6. Caracterización de antocianinas

La espectroscopía de UV-VIS es la principal técnica usada para la cuantificación de antocianinas debido a su simpleza y a su bajo costo.²⁷ La espectrometría de masas (EM) y la resonancia magnética nuclear (RMN) se han convertido en las técnicas más usadas para la identificación de antocianinas.¹⁹

La espectrometría de masas es una técnica muy utilizada en el análisis de productos naturales, proporciona información del peso molecular exacto y la fragmentación que sufre la molécula, lo que permite conocer su estructura. En el análisis de antocianinas las técnicas de ionización utilizadas son: APCI-MS (Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry), FAB-MS (Fast Atom Bombardeer-Mass Spectrometry) y ESI-MS (ElectroSpray Ionization-Mass Spectrometry) que están generalmente acopladas a CLAR.

4. Generalidades del Maíz

4.1. Descripción general

El maíz pertenece a la familia de las gramíneas, al género *Zea*; éste comprende cuatro subespecies que se sabe son originarias de México y Centroamérica: **(1)** *Zea mays L. ssp huehuetenangensis*, **(2)** *Zea mays L. ssp mexicana*, **(3)** *Zea mays L. ssp. parviglumis (teocintle)* y **(4)** *Zea mays L. ssp. mays* a esta última pertenece el maíz y es la única subespecie cultivada de este género. La domesticación ha determinado una de las características más notables del maíz que generó una amplia variedad de razas. Estas razas son tan diversas que su número va de 220 a 300. En América se ha originado el 90% de todas las razas,²⁸ de las cuales se ha demostrado que 64 razas son originarias de México, dentro de estas razas se encuentran maíces con diferentes tonalidades de blanco, amarillo, rojo, morado, púrpura y azul. (Figura 7)

El área destinada a la producción de maíz en México es aproximadamente de 10 millones de hectáreas. El maíz ha sido y sigue siendo el producto de mayor consumo nacional, es la fuente principal de carbohidratos.²⁹ En general, la producción de maíz a nivel industrial se ha enfocado al maíz blanco,



Figura 7. Variedad de maíces encontrados en México⁷⁷

MARCO TEÓRICO

mientras que los maíces pigmentados son producidos por agricultores locales en pequeñas superficies para autoconsumo, aunque hoy en día existen regiones muy definidas como Puebla y el Estado de México en donde el maíz pigmentado o criollo es altamente demandado, inclusive se pueden observar parcelas con aproximadamente un tercio de su superficie sembrada con maíces coloridos.³⁰

Los usos que se le ha dado al maíz dependen de la parte de la planta y su estado de madurez, así tienen un uso específico debido a que poseen características y propiedades tecnológicas diferentes. El grano seco es usado para la elaboración de tortillas, tostadas, atole, tamales, totopos, pinole, pozole, pozol, etc. Las hojas que cubren el fruto del maíz, también llamadas totomoxtle, son usadas para envolver tamales; el olote se usa como alimento para animales, el tallo se usa como combustible e incluso los hongos de la mazorca tierna se usan como alimento (Huitlacoche). En México se han documentado más de 600 recetas de alimentos preparados con base en el maíz, además de su uso en bebidas y como medicamento.

4.2. Etapas de crecimiento del maíz

El proceso de crecimiento del maíz pasa por etapas que van desde el sembrado hasta la maduración del grano (Figura 8). Este proceso de crecimiento comienza con la nascencia, fase que se extiende desde la siembra hasta la aparición del coleóptilo (las primeras hojas de la plántula). La etapa de nascencia dura entre 6 y 8 días. Después llega el período donde crecen las hojas con una frecuencia de una cada tres días, y en cuatro o cinco semanas, la planta tiene formadas todas sus hojas. Luego viene la etapa de floración, después de 4 a 6 semanas comienza la emisión del polen que dura de 5 a 8 días comenzando así la reproducción, y posteriormente dando paso a la formación del jilotillo, elote y mazorca sucesivamente. Con la aparición del jilotillo comienza el llenado del grano con almidón. Finalizado el proceso de maduración (elote). Después da comienzo la senescencia, provocando la sucesiva pérdida de humedad la que le da el carácter de mazorca.³⁰

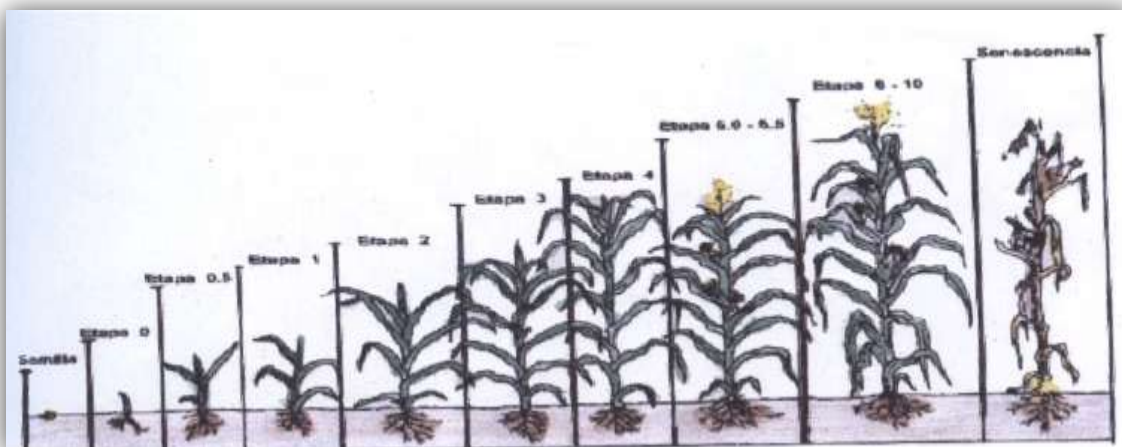


Figura 8. Ciclo de crecimiento del maíz.⁷⁸

4.3. Antocianinas de maíz

El color de los maíces se debe a la presencia de antocianinas y esta coloración puede variar como se observa en la Figura 9, donde se presentan diversos maíces de la región de Tlaxcala. La presencia de antocianinas en las variedades pigmentadas del maíz, lo hace un producto potencial para el suministro de colorantes y antioxidantes naturales. Por ello países como China, Bolivia, y Estados Unidos han incrementado en los últimos años las investigaciones de antocianinas del maíz morado e inclusive la extracción a nivel industrial.¹⁵



Figura 9. Variedad de maíces en Tlaxcala

Se han realizado estudios acerca del contenido de antocianinas en los granos de maíces coloridos y en algunos otros órganos de la planta,³¹ también se han estudiado los tipos de antocianinas e incluso los genes que controlan su síntesis y se encontró que las antocianinas pueden estar presentes en todas las estructuras de la planta, el olote, el totomoxtle y los granos. (Figura 10)

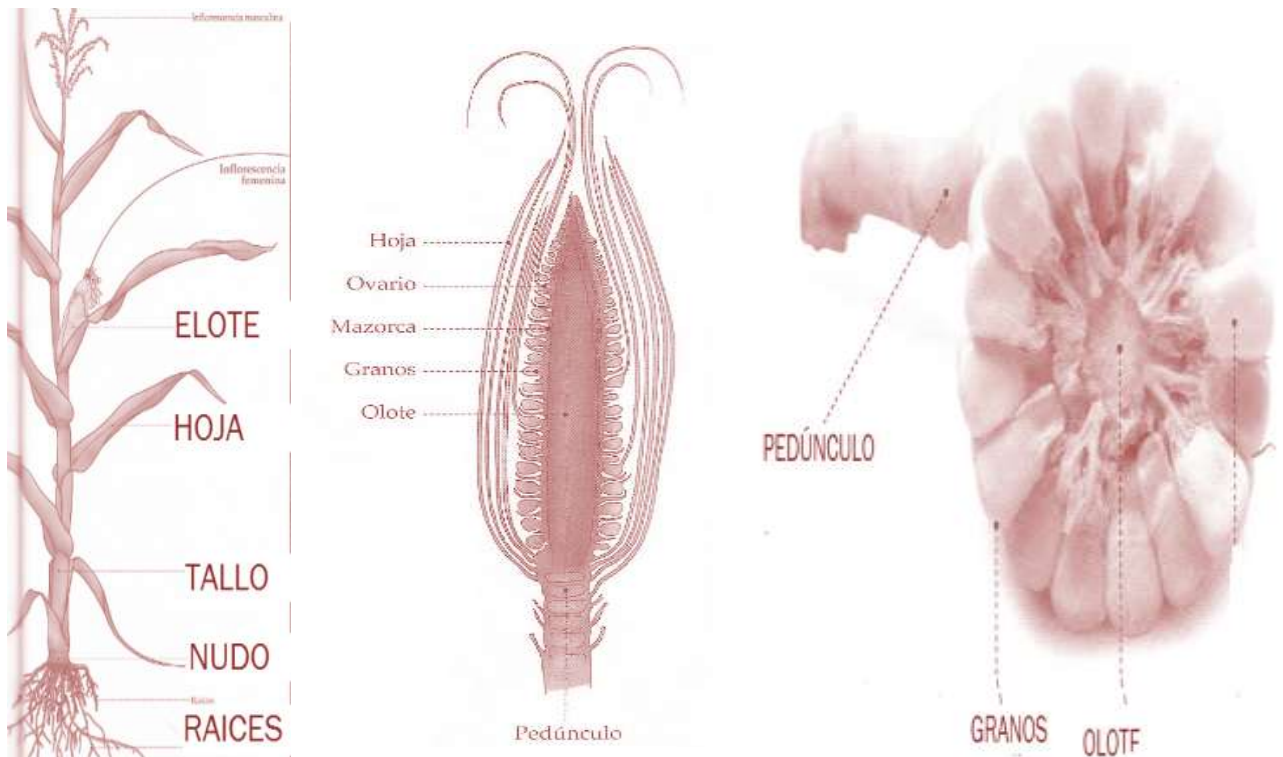


Figura 10. Morfología básica del maíz.⁷⁹

MARCO TEÓRICO

Las antocianinas del grano de maíz pueden estar presentes en el pericarpio o en la capa de aleurona (Figura 11). Si las antocianinas contenidas en el grano del maíz, se acumulan en el pericarpio, y su concentración es alta, entonces estos se usan para extraer los pigmentos,²⁸ también se pueden acumular en la aleurona, dando con ello un grano que puede usarse en el proceso de nixtamalización para la elaboración de productos con tonalidades azules, ya que en el proceso de molienda no se logra separar la aleurona del endospermo efectivamente. La cantidad y tipo de antocianinas presentes en los granos de maíz hacen que exista variación en el color del grano. Los maíces con alto contenido de cianidina (un tipo de antocianina) tienen tonalidades azul/morado, mientras que los que contienen una baja cantidad tienen tonalidad rojiza. Los derivados más comunes de la cianidina en el maíz contienen un sustituyente malonil. El grano de maíz morado es el más estudiado por su alta concentración de antocianinas y actualmente es utilizado para la extracción de pigmentos. Los contenidos de antocianinas totales varían de acuerdo a las técnicas de extracción y del germoplasma utilizado.²⁸

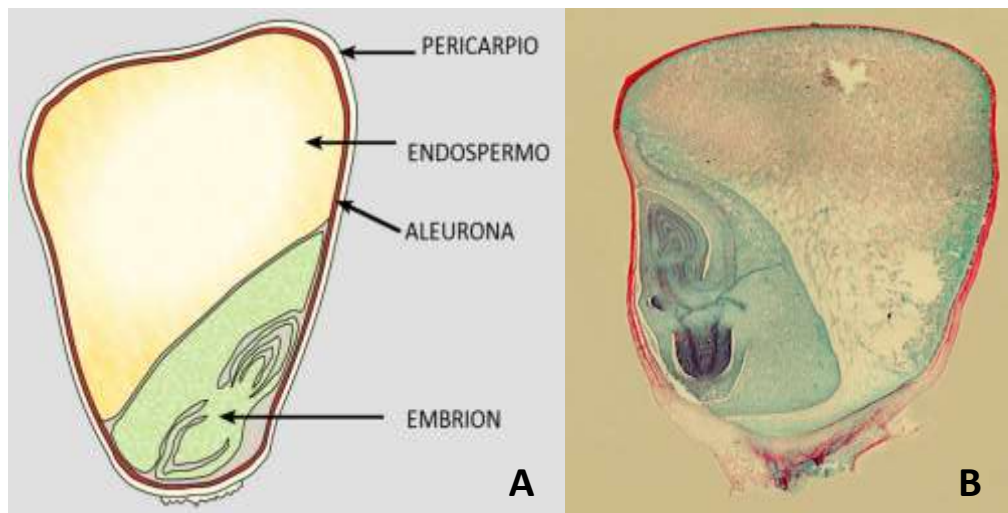


Figura 11. A. Esquema del grano de maíz.⁸⁰ B. Microscopia del grano de maíz en el cual se observa el color rojo en el pericarpio.⁸¹

En los últimos años se han publicado diversos trabajos sobre identificación de antocianinas en el grano de maíz. Al inicio se realizó mediante técnicas cromatográficas en papel y en capa fina, así se identificó la cianidina-3-O-glucósido, pelargonidina-3-O-glucósido y algunos derivados acilados.³² Actualmente mediante el uso de CLAR-EM⁺ (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, acoplado a espectrometría de masas) se puede determinar la estructura química de cada antocianina, como en el estudio realizado por Jing en 2007, el cual identificó

MARCO TEÓRICO

las nueve antocianinas contenidas en el maíz morado, dentro de las cuales se encontraron las antocianinas aciladas cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido y la cianidina-3-dimalonilglucósido.⁷ El grano de maíz utilizado en la mayoría de estos trabajos ha sido el maíz morado, que se cultiva en la región andina, principalmente la raza primitiva Kulli y la raza incipiente morado canteño.³³ Los análisis se han efectuado directamente a partir del grano molido. El perfil de antocianinas y su identidad fueron similares a las contenidas en otros maíces de los cuales se han aislado e identificado entre 8 y 11 antocianinas. La concentración de antocianinas en los granos de diferentes variedades de maíz van de 0.5-5.6 mg/g mientras que en el olote son de alrededor de 9 mg/g y en el totomoxtle hasta de 24 mg/g (Cuadro 1). Del total de las antocianinas conocidas las que se encuentran en mayor proporción son: cianidina-3-O-glucósido, cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido y peonidina-3-O-glucósido y las presentes en menor proporción son: peonidina-3-O-(6''-malonil)glucósido, pelargonidina-3-O-glucósido y pelargonidina-3-O-(6''-malonil)glucósido. Debe tenerse en cuenta que la proporción relativa de las antocianinas en granos del mismo color es variable y puede modificarse por efecto del genotipo y del ambiente de producción.²⁸

Cuadro 1 Concentración y tipo de antocianinas encontradas en maíces coloridos

Maíz (Lugar)	Concentración (mg/g)	Antocianinas mayoritarias	Referencia
Grano de maíz morado raza Kulli (Cochabamba, Bolivia)	No reportado	Cianidina-3-O-glucósido Cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido	15
Grano maíz Shaman azul (mercado, Ontario, Canadá)	0.225	Cianidina-3-O-glucósido	34
Grano maíz morado raza Kulli (mercado, Ontario, Canadá)	0.965	Cianidina-3-O-glucósido Cianidina-3-O-succinilglucósido	34
Grano maíz rosa (mercado, Ontario, Canadá)	0.093	Cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido	34
Grano maíz rojo (mercado, Ontario, Canadá)	0.558	Cianidina-3-O-glucósido Peonidina-3-O-glucósido	34
Grano maíz morado raza no especificada (Cd. de Fengyang, China)	0.558	Cianidina-3-O-glucósido Pelargonidina-3-O-glucósido	31
Olote maíz morado raza no especificada (Cd. de Fengyang, China)	0.923	Cianidina-3-O-glucósido Cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido Pelargonidina-3-O-glucósido	31
Olote de maíz morado raza no especificada (Chorrillos-Lima, Perú)	9.8	Cianidina-3-O-glucósido Cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido Peonidina-3-O-glucósido	35
Olote de maíz morado raza no especificada (Norteamérica)	2.9-13	Cianidina-3-O-glucósido Cianidina-3-O-succinilglucósido	36
Totomoxtle de maíz morado raza no especificada (Norteamérica)	0.5-18	Cianidina-3-O-glucósido Cianidina-3-O-succinilglucósido	36

5. Generalidades de Salvias

Las salvias son el género más numeroso de la familia *Lamiaceae*, con 700 a 900 especies, este género se distribuye extensamente especialmente en América Central y Sudamérica, y ha despertado el interés en su investigación fitoquímica desde hace muchos años debido a que a muchas salvias se les atribuyen propiedades curativas. Algunas especies son de gran importancia económica, debido a su contenido de aceites esenciales que son utilizados en la industria alimenticia y cosmética.

5.1. Definición y distribución

El nombre de salvia viene del latín *salvare* (significa curar) aludiendo a las virtudes medicinales de una gran variedad de especies aromáticas del género. La familia *Lamiaceae* incluye alrededor de 900 especies con una distribución casi cosmopolita sus principales centros de diversidad están en el sureste de Asia, Mesoamérica y Sudamérica.³⁷ Existe un gran número de salvias en México como lo son la *Salvia mexicana*, *S. hispánica*, *S. microphylla*, *S. polystachya*, *S. leucantha*, *S. purpurea*, *S. amarissima*, *S. lasiantha*, etc.

Algunas salvias han sido cultivadas a lo largo de la historia por sus diversas aplicaciones como plantas medicinales o como especies aromáticas para la industria alimentaria, del perfume y cosmética. Por ejemplo la *S. miltiorrhiza* es usada para el tratamiento de enfermedades coronarias, cardiovasculares, hepatitis e insomnio.³⁸ Estudios químicos del género salvia muestran que contienen diterpenos como sus principales metabolitos y en los última década se ha puesto mucha atención en los compuestos hidrofílicos como algunos polifenoles, que presentan actividades antioxidantes, antitumorales y antivirales.³⁸

5.2. Composición química de salvias

Las salvias contienen una gran variedad de compuestos principalmente triterpenos y diterpenos y también los ácidos fenólicos que constituyen la mayor parte de los componentes solubles en agua. En el caso de la *Salvia microphylla* que esta distribuida en México se han encontrado en sus partes aereas triterpenos como el eritrodiole-3-acetato, lupeol y el ácido oleanólico, diterpenos como el ácido 7- α -hidroxisandaracopimárico, ácido 7,15-isopimaradien-14 α -18diol, entre otros. En la *Salvia coccinea* también se han encontrado sitoesteroles y triterpenos.³⁹ Los ácidos derivados del ácido salvianólico son constantes en *S. miltiorrhiza*, *S. chinensis* y *S. yunnanensis* además de los ácidos benzoicos, protocatequínico, vainillínico, 2,4-dimetoxibenzoico. El ácido cafeico juega un papel central en la bioquímica de la familia

Lamiaceae y se presenta principalmente como dímero. En diferentes especies de salvias el ácido cafeico es la unidad fundamental de los metabolitos fenólicos que pueden estar como monómeros y oligómeros. Los trímeros y tetrámeros son los de mayor interés en la industria farmacéutica ya que presentan actividades biológicas importantes. El ácido rosmarínico es el más abundante dímero del ácido cafeico presente en las especies de *Salvias*, el cual se ha reportado que es el principal responsable de la capacidad antioxidante.³⁸







Las salvias son fuentes importantes de polifenoles, flavonoides y ácidos fenólicos. Las flavonas, flavanoles y sus glucósidos constituyen la mayor parte de los flavonoides presentes. Las antocianinas altamente aciladas con ácidos malónico, cafeico y cumárico son abundantes en las flores rojas o azules que presentan algunas salvias, además forman complejos con otros flavonoides dando así una mayor estabilidad al pigmento.³⁸

5.3. Antocianinas en salvias

Las salvias son plantas con abundantes flores y el color de la flor depende de la especie. Se ha encontrado que las antocianinas de *S. splendens* son derivados de la pelargonidina.⁴ Por otra parte, se han identificado las antocianinas de la *S. uliginosa* que contiene a la delphinidina como base estructural, la cual está glucosilada y contiene además grupos acilo de los ácidos *p*-cumárico, malónico y acético.⁹ En el Cuadro 2 se presenta una revisión de las antocianinas presentes en salvias. Por otra parte, estudios de 10 especies de salvias mostraron que las flores de color rojo y rosa contenían pelargonidina, las azules delphinidina y las moradas y violetas a derivados de la cianidina cuyas estructuras principales se muestran en la Figura 12.⁴⁰

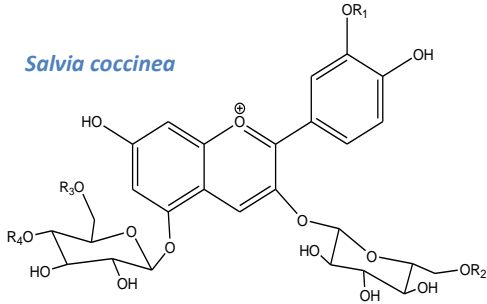
MARCO TEÓRICO

Cuadro 2. Antocianinas presentes en las flores de salvias estudiadas hasta el 2002. ³⁸

Salvia	Color de la flor	Antocianinas
<i>Salvia coccinea</i>	Rojo 	Pelargonidina-3-O-(6''-cafeoilglucósido)-5-(4''',6'''-dimalonilglucósido) -Salvianina- Pelargonidina-3-O-(6''-p-cumaroilglucósido)-5-(4'',6''-dimalonilglucósido) -manardaeina- Cianidina-3-O-(6''-p-cafeoilglucósido)-5-(4''',6'''-dimalonilglucósido) Cianidina-3-O-(6''-cafeoilglucósido)-5-(6''''-malonilglucósido) Cianidina-3-O-(6''-cafeoilglucósido)-5-glucósido
<i>Salvia splendens</i>	Rojo 	Pelargonidina-3-O-(6''-cafeoilglucósido)-5-(6''''-malonilglucósido) Pelargonidina-3-O-(6''-cafeoilglucósido)-5-glucósido Pelargonidina-3-O-(6''-cumaroilglucósido)-5-(6''''-malonilglucósido) Pelargonidina-3-O-(6''-cumaroilglucósido)-5-glucósido
<i>Salvia patens</i>	Azul 	Delfinidina-3-O-(6''-p-cafeoilglucósido)-5-(6''''-malonilglucósido)
<i>Salvia uliginosa</i>	Azul 	Delfinidina-3-O-(6''-p-cumaroilglucósido)-5-(4''''-acetil-6''''-malonilglucósido) Delfinidina-3-O-(6''-p-cafeoilglucósido)-5-(6''''-malonilglucósido)
<i>Salvia farinacea</i>	Azul 	Delfinidina-3-O-(6''-p-cafeoilglucósido)-5-(6''''-malonilglucósido)
<i>Salvia horminum</i>	Morada 	Cianidina-3-O-(6''-p-cumaroilglucósido)-5-glucósido

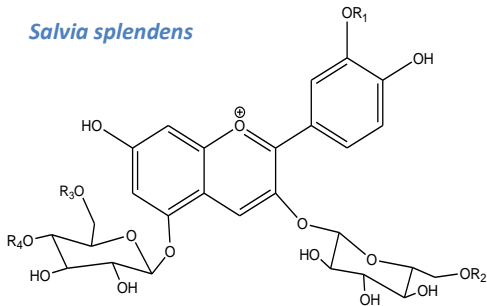
MARCO TEÓRICO

Salvia coccinea



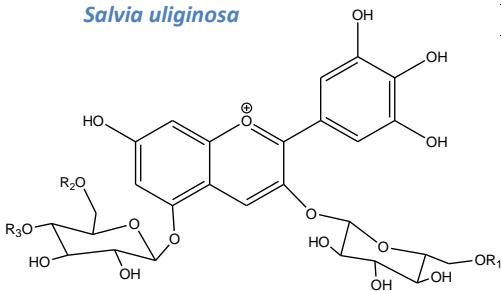
R1	R2	R3	R4	
H	cafeoil	malonil	malonil	Salvianina
H	cumaroil	malonil	malonil	Manardaeina
OH	cafeoil	malonil	malonil	
OH	cafeoil	malonil	H	
OH	cafeoil	H	H	

Salvia splendens



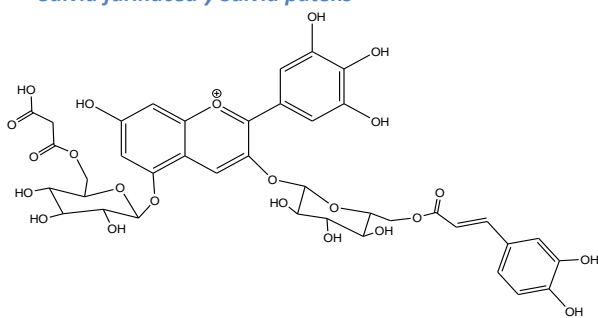
R1	R2	R3	R4	
H	cafeoil	H	malonil	
H	cafeoil	H	H	
H	cumaroil	H	malonil	
H	cumaroil	H	H	

Salvia uliginosa



R1	R2	R3
cumaroil	malonil	acetil
cafeoil	malonil	H

Salvia farinacea y *Salvia patens*



Salvia horminum

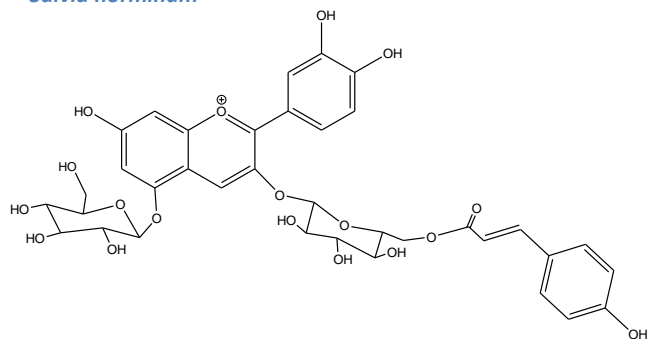


Figura 12. Antocianinas aciladas de especies de salvias

MARCO TEÓRICO

Las antocianinas pueden formar complejos que aumentan la estabilidad del pigmento, un ejemplo de los complejos formados por las antocianinas con otros flavonoides es el que está presente en la *S. patens* en el que su principal antocianina es la delphinidina-3-O-(6''-p-cumaroilglucósido)-5-(6'''-malonilglucósido) y forma un complejo muy estable con la 7-4'-diglucosilapigenina y el catión magnesio (Figura 13) en donde varias unidades de antocianina y de apigenina interaccionan con el catión Mg^{2+} .⁴¹

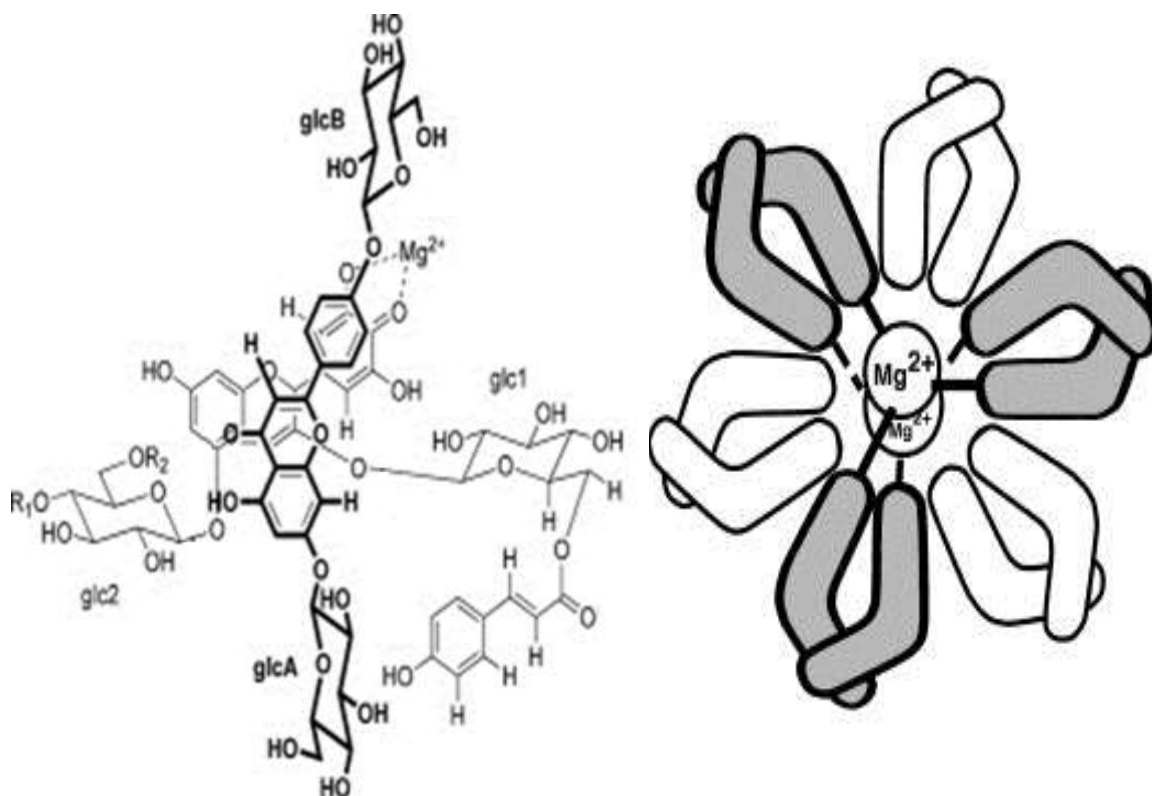


Figura 13. Complejo antocianina, apigenina y Mg^{2+} .⁴¹

HIPÓTESIS

- * El maíz morado de Ixtenco y el maíz cacahuacintle contienen antocianinas aciladas en diferentes órganos de la planta y es posible que la concentración de antocianinas aciladas sea mayor en algún órgano y en alguna etapa específica de crecimiento.
- * Se ha encontrado que las flores de algunas especies de salvias de América, como la *Salvia patens*⁴² y la *S. coccinea*⁴, tienen una alta concentración de antocianinas aciladas. Por lo tanto, se encontrará una alta concentración de antocianinas aciladas en las salvias presentes en México.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Cuantificar e identificar antocianinas aciladas de maíz criollo morado y cacahuacintle y de nueve salvias mexicanas.

Objetivos Particulares

- Extraer y cuantificar las antocianinas totales de las muestras vegetales seleccionadas.
- Desarrollar un método de identificación de antocianinas aciladas por CCF y CLAR.
- Obtener, purificar y caracterizar los principales estándares de antocianinas glicosiladas: cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido y cianidina-3-(6''-malonil)glucósido a partir de fuentes vegetales.
- Cuantificar antocianinas y fenoles totales del totomoxtle, olote y grano del maíz morado y del totomoxtle y olote del maíz cacahuacintle.
- Cuantificar las antocianinas del maíz morado de Ixtenco y cacahuacintle en diferentes estados de maduración.
- Caracterizar las principales antocianinas del maíz morado de Ixtenco y el maíz cacahuacintle utilizando espectrometría de masas.
- Cuantificar antocianinas y fenoles totales de las salvias: *Salvia leucantha*, *S. mexicana*, *S. amarissima*, *S. polystachya*, *S. lineata*, *S. hispanica*, *S. lasiantha*, *S. purpurea* y *S. fulgens*.
- Caracterizar las principales antocianinas presentes en las salvias utilizando espectrometría de masas.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

- * Placas de sílice de 0.2mm
- * Sephadex LH-20 XAD-7HP
- * Ambertila
- * Filtros de 0.45 μm de nylon
- * Metanol
- * Ácido acético (SIGMA)
- * Ácido clorhídrico (SIGMA)
- * Agua destilada
- * Agua deionizada
- * Metanol y ácido trifluoroacético ambos deuterados (FLUKA y SIGMA)

Equipo

- * Molino KRUPS GX4100
- * Lámpara UV como revelador
- * Sonicador Branson 3510 potencia: 100W, 42Hz
- * Rota evaporador (Büchi)
- * Balanza analítica OHAUS AP1105
- * Cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC: Autoinyector Waters 2707, bomba Waters 1525, detector UV Waters 2478 y desgasificador.
- * Columna Hypersil GOLD 250x4.6 mm, 5 μm . Thermo Scientific
- * Espectrofotómetro GBC-CINTRAL
- * Amberlita XADH7
- * Sephadex LH-20
- * Espectrómetro de RMN (Agilent DD2 600 con One NMR Probe)
- * Espectrómetro de masas

PARTE EXPERIMENTAL

En este proyecto se obtuvieron antocianinas aciladas a partir de fuentes naturales presentes en México. Para lograr este objetivo fue necesario desarrollar una metodología con la cual, de manera preliminar, se puedan detectar las antocianinas aciladas de manera rápida y sencilla.

Por este motivo se dividió el proyecto en:

- 1) Desarrollo de la metodología para la detección de antocianinas aciladas.
- 2) Cuantificación e identificación de antocianinas aciladas presentes en maíces y salvias

A continuación se presenta un diagrama general de la metodología a seguir para la caracterización de antocianinas. (Figura 14)

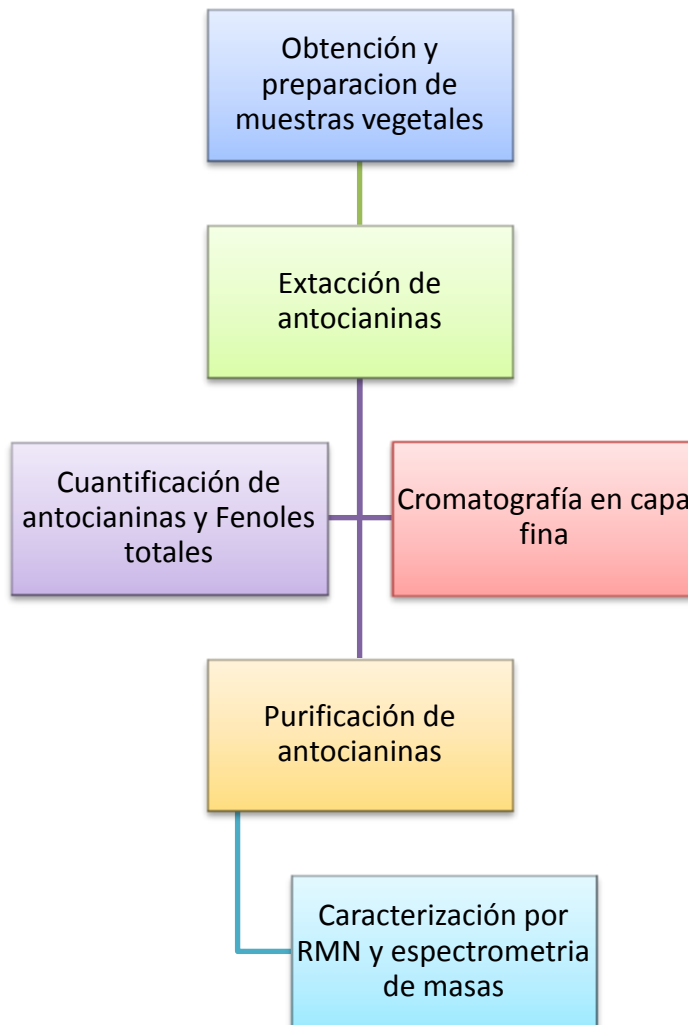


Figura 14. Diagrama de la parte experimental

PARTE EXPERIMENTAL

1. Preparación de muestras

Las muestras utilizadas para desarrollar el método de detección de antocianina aciladas se muestra en el Cuadro 3 y en las muestras de maíces y salvias se muestran en el Cuadro 4. La clasificación de las salvias se realizó por los M en C. Biológicas Shizi Luna Alcántara y Francisco Basurto Peña del Instituto de Biología, UNAM.

Las muestras se secaron utilizando el método de secado en estufa a 45°C por 72 horas por dos razones: la inactivación enzimática y la degradación térmica de las antocianinas que se lleva a cabo a temperaturas normales de secado (90°C, 24 h). En la Figura 15 se muestran las flores de la *Salvia lineata* secas.



Figura 15. *S. lineata* secada a 45°C durante 72 horas

Para cumplir con el objetivo principal de este trabajo fue necesario buscar un método de detección de antocianinas aciladas para poder determinar las fuentes vegetales que contenían este tipo de antocianinas. El desarrollo del método se realizó por cromatografía en capa fina (CCF) y por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y se utilizaron muestras vegetales cuya composición de antocianinas ya está reportada. Las muestras utilizadas en esta etapa se presentan en el Cuadro 3.

PARTE EXPERIMENTAL

Cuadro 3. Información del origen de las muestras para la identificación de antocianinas aciladas

MATERIAL VEGETAL	LUGAR	FECHA	OBSERVACIONES
Espinosilla (<i>Loeselia mexicana</i>)	Reserva de Ciudad Universitaria	03 Diciembre 2012	
Jamaica (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	Mercado	03 Diciembre 2012	No se realizó ningún tratamiento
Granada (<i>Punica granatu</i>)	Bosque de Tlalpan	03 Diciembre 2012	
Jacaranda (<i>Jacaranda mimosifolia</i>)	Reserva de Ciudad Universitaria	03 Febrero 2013	
Dalia (<i>Dalias cactus</i>)	Bosque de Tlalpan	03 Diciembre 2012	
Aguacate (<i>Persea americana</i> var. Hass)	Supermercado	Noviembre 2012	*
Higo (<i>Ficus carica</i>)	Mercado	Junio 2013	*
Mango (<i>Mangifera indica</i> L.)	Mercado	Junio 2013	*
Ciruela (<i>Prunus domestica</i>)	Mercado	Junio 2013	*
Maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>)	Mercado	Junio 2013	*
Berenjena (<i>Solanum melongena</i>)	Mercado	Junio 2013	*
Zarzamora (<i>Rubus fruticosus</i>)	Mercado	Junio 2013	
Granada (<i>Punica granatum</i>)	Mercado	Junio 2013	*
Fresa (<i>Fragaria vesca</i>)	Mercado	Junio 2013	Se utilizó toda la fruta sin secar
Cereza cepillo (<i>Eugenia myrtifolia</i>)			*
Jaboticaba (<i>Myrciaria cauliflora</i>)	Vivero Cocoyóc Morelos	Mayo 2013	*
Diente de león (<i>Taraxacum officinale</i>)	Reserva de Ciudad Universitaria	Mayo 2013	Se utilizaron las hojas y los tallos
Madroño (<i>Arbutus unedo</i>)	Reserva de Ciudad Universitaria	Mayo 2013	Se recolectaron únicamente las hojas
Lechuga morada (<i>Lactuca sativa</i>)	Mercado de San Juan	Abril 2013	
Cebolla morada (<i>Allium cepa</i>)	Supermercado	Junio 2013	No se le realizó el tratamiento térmico
Col morada (<i>Brassica oleracea</i>)	Supermercado	Junio 2013	
Zanahoria morada (<i>Daucus carota</i>)	Mercado de San Juan	Abril 2013	No se le realizó el tratamiento térmico
Rábano (<i>Raphanus sativus</i>)	Supermerado	Junio 2013	Se utilizó únicamente la cáscara
Papa de agua (<i>Oxalis tuberosa</i>)	Mercado de San Juan	Abril 2013	
Camote morado (<i>Ipomoea batatas</i>)	Mercado de San Juan	Abril 2013	Se liofilizó

*Se usó únicamente la cáscara del fruto

PARTE EXPERIMENTAL

Los maíces y salvias utilizados se enlistan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Información del origen de los maíces y salvias.

	LUGAR	FECHA	OBSERVACIONES
Maíz (<i>Zea mays</i>) morado de Ixtenco	Ixtenco, Tlaxcala	Agosto–Noviembre 2013	Se separó el olote, totomoxtle y se secó a 45°C por 72 hr. Y en el caso del grano se liofilizó.
Maíz (<i>Zea mays</i>) Cacahuacintle	Ixtenco, Tlaxcala	Agosto– Noviembre 2013	Se separó el olote, totomoxtle y se secó a 45°C por 72 hr.
<i>Salvia polystachya</i>	Bosque de Tlalpan	15-17 octubre 2013	
<i>Salvia mexicana</i>	Bosque de Tlalpan	15 de octubre 2013	
<i>Salvia amarissima</i>	Bosque de Tlalpan	10 de agosto 2013	
<i>Salvia fulgens</i>	Bosque de Tlalpan	29 de octubre 2013	
<i>Salvia lineata</i>	Miahuatlán, Puebla	20 de octubre 2013	
<i>Salvia purpurea</i>	Tepozotlán, Puebla	29 de octubre 2013	
<i>Salvia leucantha</i>	Tepozotlán, Puebla	Diciembre 2012	
<i>Salvia hispanica</i>	Bosque de Tlalpan	Octubre 2013	
<i>Salvia lasiantha</i>	Miahuatlán, Puebla	04 noviembre 2013	

2. Método para la detección de antocianinas aciladas

Se utilizaron muestras vegetales de composición conocida de antocianinas, representando así los principales tipos de antocianinas. Los extractos de estas muestras se les realizó CCF y se inyectaron por CLAR para identificar cada antocianina.

La extracción de antocianinas se hizo a partir de 1.0 – 2.0 g de material vegetal con 10 – 20 mL de MeOH:Agua:HCl (80:20:0.1) y se utilizó un baño ultrasónico de 100 W durante 20 minutos y posteriormente se filtró. En el Cuadro 5 se muestran las fuentes vegetales y las principales antocianinas que se han identificado en trabajos anteriores. Estas muestras representan a las principales antocianinas, así como el patrón de sustitución más común en la naturaleza.

PARTE EXPERIMENTAL

Cuadro 5. Antocianinas mayoritarias en cada una de las muestras analizadas

Fuente	Antocianinas reportadas	Ref.
Aguacate	Cianidina-3-O-glucósido	43
Maracuyá	Cianidina-3-O-glucósido	44
Madroño	Cianidina-3-O-galactósido	45
Mango	Peonidina-3-O-galactósido	46
Espinosilla	Pelargonidina-3-O-glucósido	47
Berenjena	Delfinidina-3,5-O-diglucósido	48
Fresa	Pelargonidina-3-O-glucósido	49
Jamaica	Delfinidina-3-O-sambubiósido y cianidina-3-O-sambubiósido	50
Ciruela	Cianidina-3-O-rutinósido	51
Higo	Cianidina-3-O-rutinósido	52
Granada	Pelargonidina-3,5-O-diglucósido	53
Cereza cepillo	Malvidina-3,5-O-diglucósido	54
Jacaranda	Delfinidina-3-O-glucósido y /o delfinidina-3,5-O-diglucósido	55
Papa de agua	Malvidina-3-O-glucósido y malvidina-3,5-O-diglucósido	56
Dalia morada	Cianidina-3-(6''malonil)-5-O-diglucósido y pelargonidina-3-(6''malonil)-5-O-diglucósido	57
Diente de león	Cianidina-3-O-(6''malonil)glucósido	58
Lechuga morada	Cianidina-3-O-(6''malonil)glucósido	59
Cebolla morada	Cianidina-3-O-glucósido y cianidina-3-O-(6''malonil)glucósido	60
Zanahoria negra	Cianidina-3-O-(2''-(xilosa)galactosil)glucósido derivado del ácido ferúlico	61
Col morada	Cianidina-3-O-(sinapil)(sinapil)-diglucósido-5-glucósido cianidina-3-O-(p-cumaroil)-5-diglucósido, cianidina-3,5-O-diglucósido	62
Rábano	Pelargonidina-3-O-(6''feruloil-2''-glucosil)glucósido-5-glucósido	63
Camote morado	Cianidin-3-O-(cafeoil)(feruloil)soforósido-5-glucósido, peonidina-3-O-soforosil-5-glucósido	64

En el Cuadro 5 se muestran las antocianinas presentes en cada fuente vegetal, en donde se tienen antocianinas glicosiladas, diglicosiladas y aciladas derivadas de la cianidina, pelargonidina, malvidina y delfinidina. Al extracto que contiene a las antocianinas se le realizó la CCF utilizando cromatoplasmas de sílica gel y como eluyente butanol, ácido acético y agua BAW (6:1:3) como reporta Zhang en 2011.⁶⁵ Adicionalmente los extractos fueron analizados por CLAR utilizando el método descrito por Fernández en 2012⁶⁶ el cual se resume en el Cuadro 6. Esta metodología de identificación de antocianinas se ha realizado anteriormente por Wu⁶⁷ y colaboradores en 2005 el cual analizó 25 frutas para la identificación de antocianinas en frutos rojos (cerezas, mora azul, ciruela, zarzamora, uva, fresa, entre otros).

Cuadro 6. Método de CLAR para antocianinas

SISTEMA	SISTEMA I		
Columna	ODS Hypersil Gold (250X4.5 mm, 5µm)		
Fase móvil	A: H ₂ O/ Ácido acético (90:10) B: MeOH/H ₂ O/Ác acético (50:40:10)		
Flujo (mL/min)	1.2		
Inyección	10 µL		
Gradiente	Tiempo (min)	A	B
	0-5	90	10
	5-10	0	100
	10-15	90	10
	20	90	10

PARTE EXPERIMENTAL

3. Obtención de los principales estándares contenidos en la cebolla morada

La extracción de antocianinas de la cebolla morada se hizo con el propósito de obtener los estándares de la cianidina-3-O-glucósido y la cianidina-3-O-(6''malonil)glucósido que están presentes en el maíz morado y posteriormente analizar el comportamiento en las síntesis de antocianinas durante el crecimiento.

Se extrajeron las antocianinas de la cebolla morada partir de 448 gramos, se adicionó 500 mL de metanol:agua:HCl (80:20:0.1) y se utilizó un baño ultrasónico de 100 W durante 20 minutos a temperatura ambiente, se filtró y concentró en un rotaevaporador a 35°C.

Al extracto obtenido se le realizaron particiones extracto líquido-líquido con hexano (2 lavados) y después con acetato de etilo (3 lavados). Posteriormente, las antocianinas se absorbieron en amberlita XAD-7HP⁶⁵ y se desabsorbieron con metanol acidificado al 0.1% HCl. Después se concentró el extracto usando el rotaevaporador a 35° C obteniéndose 291 mg de antocianinas. Se realizó una cromatografía en placas de gel de sílice y se usó como revelador una lámpara de UV y sulfato cérico. La cianidina-3-O-glucósido y la cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido se encuentran en una proporción de 1 a 3 en el extracto, como se muestra en la Figura 16.

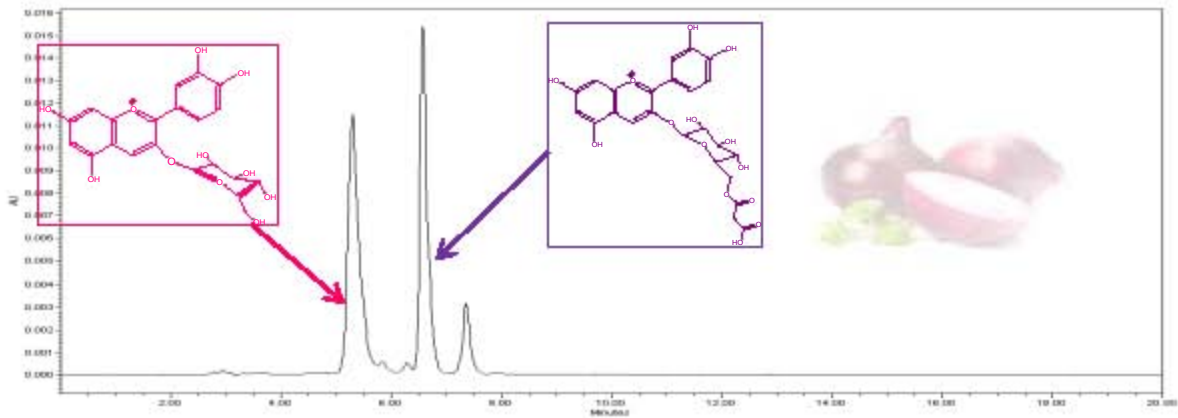


Figura 16. Cromatograma del extracto de cebolla morada

Para separar la cianidina-3-O-glucósido de la cianidina-3-O-(6''malonil)glucósido se utilizó una columna de Sephadex LH-20, se probaron diferentes tamaños de columna, la que dio mejores resultados fue de 4 x 18 cm con 30 g de sephadex LH-20, se lavó con 0.01%HCl y se eluyó con un gradiente de metanol, empezando con H₂O:MeOH:HCl (79.99:20:0.01), H₂O:MeOH:HCl (59.99:40:0.01) y H₂O:MeOH:HCl (49.99:50:0.01). Se obtuvieron 28 fracciones la cuales fueron analizadas por CLAR, las fracciones 24 a 27 correspondían a la cianidina-3-O-glucósido y las fracciones 14 a 16 correspondían a la cianidina-3-O-(6''malonil)glucósido con un porcentaje de

PARTE EXPERIMENTAL

92% y 86% de pureza con respecto a la CLAR respectivamente. Se utilizaron 7 mg de extracto de antocianinas del que se obtuvieron 2.0 mg de cianidina-3-O-(6''malonil)glucósido y 0.6 mg de cianidina-3-O-glucósido las cuales se analizaron por RMN.

La RMN de ^1H , ^{13}C , COSY y HSQC se realizó en un espectrómetro de 600 MHz, las antocianinas se disolvieron en 300 μL de MeOH con una gota de CF_3COOD para asegurar que esté como ion flavilio.⁶⁸

4. Evaluación de las antocianinas de maíz del maíz morado de Ixtenco y del maíz cacahuacintle

Las muestras que se analizaron fueron dos tipos de maíces: el cacahuacintle y maíz morado de Ixtenco, Tlaxcala ambos originarios de México. Se analizaron tres estados de maduración de cada maíz los datos de la recolección se muestran en el Cuadro 7 donde se indica que el periodo de análisis fue entre los 70 y 160 días después de la siembra (dds).

Cuadro 7. Datos de recolección de los maíces

Tiempo 1	25 agosto 2013	70 días después de la siembra
Tiempo 2	06 octubre 2013	113 días después de la siembra
Tiempo 3	28 noviembre 2013	160 días después de la siembra

En la Figura 17 se esquematizan los pasos que se siguieron para el análisis de los dos tipos de maíces.



Figura 17. Esquema general del análisis de antocianinas del maíz morado de Ixtenco y del maíz cacahuacintle

Los granos de maíz se liofilizaron y el olote y totomoxtle se secaron a 45°C durante 72 horas. Las muestras fueron molidas y tamizadas con una malla No 60 (0.246 μm). La extracción se realizó conforme el punto dos de esta sección. Se eliminaron las impurezas del extracto de

PARTE EXPERIMENTAL

antocianinas realizando particiones extracción líquido-líquido con hexano (2 lavados) y acetato de etilo (4 lavados); posteriormente, las antocianinas se absorbieron en amberlita XAD-7HP y se desabsorbieron con metanol acidificado al 0.1% HCl, finalmente se concentró el extracto de antocianinas hasta sequedad utilizando un rotaevaporador a 35°C.

Del extracto de cada parte de los maíces analizados se tomó 1 mg y se analizó por espectrometría de masas usando electrospray modo positivo como método de ionización (EM-IES⁺). Además se analizaron antocianinas totales usando el método pH-diferencial y fenoles totales usando el método de Folin-Ciocalteu con el fin de conocer la variación de la concentración total de estos compuestos en tres etapas de maduración y por último, se analizó por CLAR la variación particular de antocianinas no aciladas (cianidina-3-O-glucósido) y aciladas (cianidina-3-O-(6''malonil)glucósido).

5. Análisis de antocianinas de salvias de México

Se recolectaron nueve especies de salvias en diferentes periodos durante el año 2013 y se analizaron de acuerdo al esquema presentado en la Figura 18.

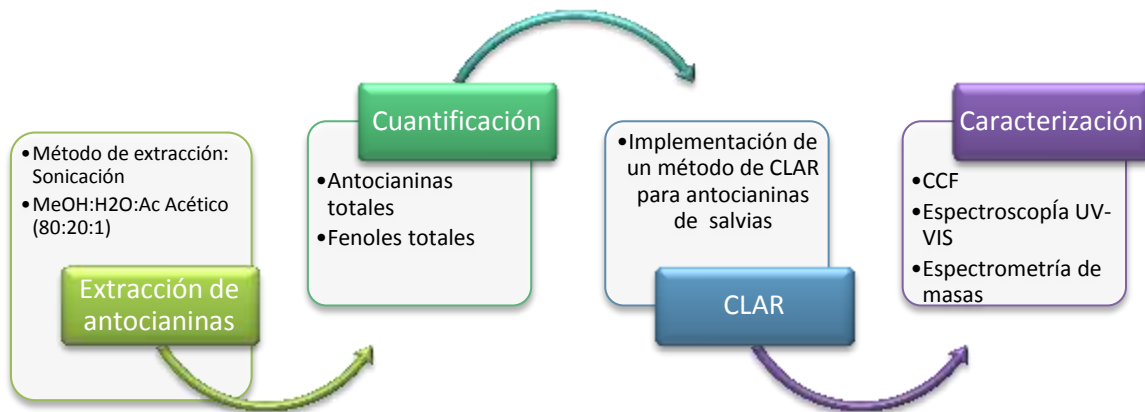


Figura 18. Esquema general del análisis de antocianinas de las flores de salvias

Las flores de salvias se secaron durante 48 horas a 45°C y posteriormente se molieron y almacenaron en un lugar seco y oscuro hasta su análisis. Se pesaron de 1 a 5 gramos de las flores de salvias secas dependiendo de la cantidad de muestra que se tenía y se le adicionaron de 10 a 50 mL de metanol:agua:ácido acético al (80:20:1) guardando una relación de soluto:disolvente de 1 a 10. Se utilizó un baño ultrasónico de 100 W durante 20 minutos y se les determinaron antocianinas y fenoles totales. Posteriormente se purificaron haciendo una partición líquido-líquido con hexano (2 lavados) y acetato de etilo (4 lavados), se absorbieron

PARTE EXPERIMENTAL

las antocianinas en amberlita XAD-7HP y se hicieron lavados con agua destilada con el fin de quitar ácidos orgánicos y azúcares y se desabsorbieron con metanol:ácido acético (99:1).

Debido a la ineficiencia del método de CLAR utilizado en la primera etapa, en el cual se utilizó como fase móvil H₂O:CH₃COOH (90:10) y MeOH:H₂O:CH₃COOH (50:40:10) con un flujo de 1.2 mL/min (Cuadro 6), se implementó un método especial para antocianinas aciladas mostrado en el Cuadro 8, con el cual fue posible tener una mejor resolución y selectividad en la separación de las antocianinas presentes en las flores de salvias.

Cuadro 8. Método de CLAR para antocianinas de *Salvias*

SISTEMA	SISTEMA II		
Columna	ODS Hypersil Gold (250X4.5 mm, 5µm)		
Fase móvil	A: H ₂ O/ACN/Ác Fórmico (87:3:10) B:ACN		
Flujo (mL/min)	1.0		
Inyección	20µL		
Gradiente	Tiempo	A	B
	0-45	97	3
	45-46	75	25
	46-47	70	30
	47-56	97	3

El extracto que contiene a las antocianinas se concentró a sequedad y se guardó en congelación hasta su análisis.

Para la identificación por espectrometría de masas (EM) se realizó una hidrólisis ácida: 1 mg de extracto que contiene antocianinas se disolvió en HCl 0.1 N y se almacenó en refrigeración durante 10 días, posteriormente se analizó por CLAR-IES⁺, para así poder identificar las antocianinas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Método de identificación de antocianinas aciladas usando CCF y CLAR

En esta parte del proyecto se desarrolló un método de CCF y CLAR para la identificación de antocianinas aciladas rápido, sencillo y que da información útil. La identificación de antocianinas se hizo mediante el Rf, coloración y tiempo de retención de antocianinas de muestras vegetales de composición conocida.

35

Cromatografía en capa fina (CCF)

La CCF permite la evaluación rápida, sencilla y de bajo costo de antocianinas aciladas analizando dos factores: la coloración y el Rf.

Coloración de las antocianinas en capa fina

En la placa de gel de sílice la cianidina, la malvidina y la peonidina presentan una coloración entre morada y rosa, la pelargonidina roja y la delphinidina azul. Este fenómeno se observa en la cromatoplaqueta en la Figura 19, en donde se observa que las muestras que tienen pelargonidina como en la fresa, granada y rábano, presentan la misma coloración roja mientras que el aguacate, higo, maracuyá, ciruela, cereza cepillo, jamaica (cianidina-3-O-sambubiósido), dalia, lechuga morada, cebolla morada, diente de león, eucalipto, madroño, col morada, camote y zanahoria presentan coloraciones que van, entre morada a rosa, tal coloración corresponde a la cianidina, malvidina o peonidina, la primera de ellas es la más común en la naturaleza. En la jamaica (delphinidina-3-O-sambubiósido), berenjena y jacaranda la coloración es azul debido a la presencia de delphinidina. Esto se observa en los extractos no purificados de las muestras y corresponde con lo reportado por Migas en el 2013.⁶⁹

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

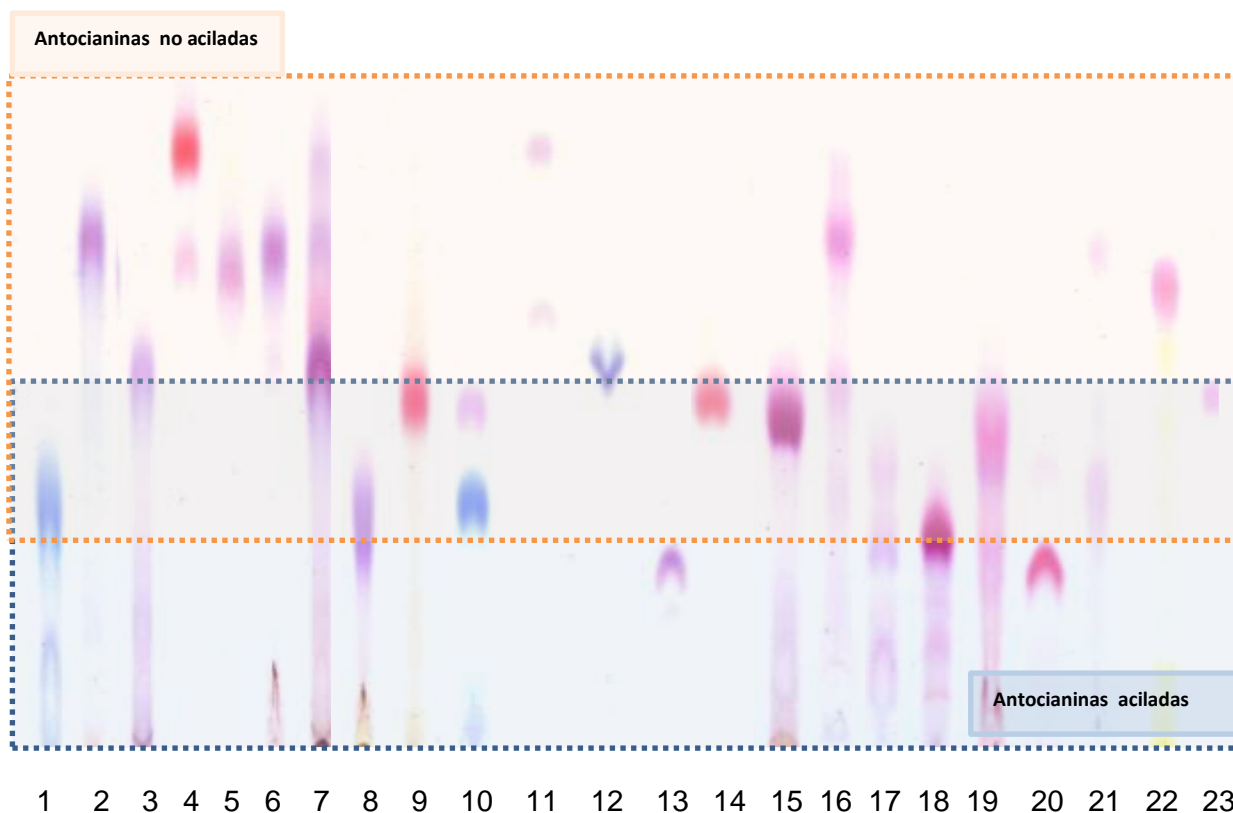


Figura 19. CCF del extracto de antocianinas de muestras conocidas (Placa de sílica gel, eluyente: Butanol:ác. acético:agua 3:1:2). 1.Berenjena 2. Aguacate, 3. Higo, 4.Fresa, 5. Mango, 6.Maracuyá, 7.Ciruela, 8. Cereza cepillo, 9.Granada, 10.Jamaica, 11.Espinosilla, 12.Jacaranda, 13.Dalia, 14. Flor de granada, 15.Lechuga morada, 16.Cebolla morada, 17. Col morada, 18. Zanahoria negra, 19. Camote morado, 20. Rábano, 21. Papa de agua, 22. Madroño y 23. Diente de León

La coloración de la cianidina en CCF es morada y esta coloración no se ve afectada por el grado de sustitución que tenga, no importa si es una antocianina monoglicosilada, diglicosilada o acilada. Por otra parte, la coloración de la pelargonidina es roja y cuando se tiene un derivado de la delfinidina se presenta una coloración azul.

Factor de Retención (Rf)

La coloración presentada por cada tipo de antocianina no proporciona información sobre la sustitución de la antocianidina, sin embargo, el Rf nos da una aproximación de la sustitución que presenta la antocianina debido a que las interacciones de los sustituyentes con el gel de sílice son diferentes.

La cromatoplatea muestra que el Rf entre 0.23 y 0.52 corresponde a las antocianinas aciladas, el Rf entre 0.33 a 0.54 corresponde a las antocianinas diglicosiladas y el Rf de 0.77 a 0.93 corresponden a las antocianinas monoglicosiladas, este comportamiento es el presentado por la malvidina, cianidina y pelargonidina, sin embargo, la delfinidina no presenta este mismo patrón. En el caso de la delfinidina-3-glucósido presenta un Rf de 0.35 mientras que la delfinidina-3,5-O-diglucósido de 0.54.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia de la antocianidina en el Rf

Los resultados muestran que el orden de elución corresponde a la D3G con Rf de 0.35, seguido de la C3G, Pn3Ga y M3G que presentan un Rf de 0.75, 0.75 y 0.77 y la P3G presentó el mayor Rf con 0.90, estos resultados son congruentes con los presentados por Cretu y colaboradores en el 2014. Cretu analizó estándares de antocianinas en fase normal, usando como fase móvil: tolueno:acetato de estilo:2-butanona:ác.fórmico (7:3:0.8:1.2) y la elución en orden ascendente fue: delphinidina-3-glucósido < cianidina-3-glucósido < malvidina-3-glucósido ≤ peonidina-3-glucósido < pelargonidina-3-glucósido.⁷⁰

Influencia del azúcar en el Rf

El orden de elución en orden ascendente fue: P35G (0.43) < P3G (0.90) para la pelargonidina y C3R (0.54) < C3Ga (0.68) < C3G (0.73) para la cianidina. Por lo tanto, el orden de elución es antocianinas glicosiladas seguido de las diglicosiladas. Estos resultados son congruentes con lo reportado por Otake y colaboradores.⁷¹

Influencia de la acilación

Por último, la acilación de las antocianinas disminuye el Rf, dependiendo del número de ácidos y azúcares presentes. Se puede identificar que la zona de antocianinas no aciladas está en el rango de Rf de 0.50 a 1 y las antocianinas aciladas de 0 a 0.5.

En resumen, la CCF permite la identificación de antocianinas no aciladas y aciladas de una forma simple, rápida, barata y permite el análisis de varias muestras al mismo tiempo. Las antocianinas aciladas se presentan en una zona entre 0.33 y 0.50 en donde las antocianinas diglicosiladas (no aciladas) también pueden aparecer. El orden de elución mostrado en función del Rf es antocianinas glicosiladas>diglicosiladas≥aciladas con ácidos alifáticos>aciladas con ácidos hidroxicinámicos.

A pesar de que se puede observar el mismo patrón de elución en las antocianidinas no es posible establecer un rango de Rf exclusivo de antocianinas aciladas, sin embargo, si es un análisis preliminar que brinda información de utilidad en el análisis de antocianinas. La estrategia en la que se utilizan dos etapas de análisis de antocianinas ya ha sido reportada por Krüger y colaboradores en el 2013, el cual evaluó por cromatografía en capa fina y por espectroscopia de UV-VIS.⁷²

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cromatografía de líquidos de alta resolución

Además del análisis por CCF, se utilizó CLAR para establecer un método para la identificación de antocianinas aciladas, ya que como se mencionó anteriormente, la CCF no permite la distinción de antocianinas diglicosiladas de antocianinas aciladas.

Influencia de la antocianidina

En el Cuadro 9 se observan los cromatogramas de las muestras conocidas. Se puede medir el tiempo de retención de las principales antocianinas, en donde el orden de elución es: D3G de 4.79 min < C3G de 5.60 min < M3G de 6.26 min < Pn3Ga de 6.39 min < P3G de 6.58 min esto se relaciona con el número de grupos hidroxilo y metoxilo presentes en el anillo B de la antocianina. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Chung-Ying y colaboradores en el 2008 el cual reporta el mismo orden de elución utilizando CLAR para estas antocianinas.³⁶

Influencia del azúcar

El número de azúcares y la posición en la molécula modifican el tiempo de retención de las antocianinas y de estos factores, el número de azúcares es el factor que provoca una mayor diferencia en el tiempo de retención debido al aumento de polaridad. El orden de elución observado en orden ascendente de acuerdo a su tiempo de retención es antocianinas diglicosiladas < antocianinas monoglicosiladas lo cual también fue observado por Alcalde-Eon y colaboradores en el 2004.⁵⁶

Influencia de la acilación

La acilación de las antocianinas aumenta su interacción con la fase estacionaria, lo que da como resultado que las antocianinas aciladas presenten los tiempos de retención más altos como se observa en el Cuadro 9.

La cianidina-3-(6''malonil)glucósido es la primera antocianina acilada en eluir con un tiempo de retención de 6.6 min, mientras que las antocianinas aciladas con ácidos hidroxicinámicos presentan un tiempo de retención alrededor de 8 min.

Con base en estos resultados se estableció la zona en la que se detectan las antocianinas aciladas. Las antocianinas aciladas eluyen a partir del minuto 6.5, las antocianinas aciladas con ácidos alifáticos eluyen primero que las antocianinas aciladas con ácidos hidroxicinámicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 9. Cromatogramas de las muestras vegetales analizadas

	tr	Cromatograma
Berenjena	4.788	
Aguacate	5.395	
Higo	5.691	
Fresa	6.581	
Mango	6.390	
Maracuyá	5.384	
Ciruella	5.523	
Cereza cepillo	4.806	
Granada	4.554	
Jamaica	3.774, 4.985	
Espinosa	6.058	
Jacaranda	5.154	
Dalia	5.498 6.613	
Lechuga morada	5.227 7.285	
Cebolla morada	5.300 6.574	
Col morada	3.453 7.566	
Zanahoria morada	5.846	
Camote morado	7.846	
Rábano	8.180	
Papa de agua	4.777 6.258	
Madroño	5.005	
Diente de León	6.598	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En resumen, en esta etapa se estudiaron las antocianinas de muestras vegetales de composición conocida, lo cual permitió a la identificación de las antocianinas principales, tanto aciladas como no aciladas. En el Cuadro 10 se muestran los Rf's y tiempos de retención obtenidos del análisis de las principales antocianinas.

Cuadro 10. Rf's y tiempos de retención de los extractos de antocianinas analizados

Antocianina	Fuente	RF	tr
Delfinidina-3-O-glucósido	Berenjena	0.35	4.79
Delfinidina-3,5-O-diglucósido	Jacaranda	0.54	5.15
Delfinidina-3-O-sambubiósido	Jamaica	0.37	3.77
Cianidina-3-O-glucósido	Maracuyá y Aguacate	0.75	5.40
Cianidina-3-O-galactósido	Madroño	0.75	5.00
Cianidina-3-O-sambubiósido	Jamaica	0.53	4.98
Pelargonidina-3-O-glucósido	Fresa y espinosilla	0.89	6.58
Malvidina-3-O-glucósido	Papa de agua	0.77	6.26
Malvidina-3,5-O-diglucósido	Papa de agua y cereza cepillo	0.33	4.78
Cianidina-3-O-rutinósido	Higo y ciruela	0.54	5.60
Peonidina-3-O-galactósido	Mango	0.70	6.39
Cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido	Diente de León y Cebolla morada	0.52	6.59
Pelargonidina-3-5-O-diglucósido	Flor de granada	0.53	4.55
Pelargonidina-3-O-(6''feruloil-2'''-glucosil)glucósido-5-glucósido	Rábano	0.23	8.18
Cianidina-3-O-(sinapoil)(sinapoil)-diglucósido-5-glucósido	Col morada	0.44	7.91
Cianidina-3-O-(p-cumaroil)-5-diglucósido	Col morada	0.32	7.56
Cianidina-3,5-O-diglucósido	Col morada	0.18	3.45

Con esta metodología es posible tener un acercamiento al tipo de antocianina presente en una muestra, usando dos herramientas para su análisis, la CCF y la CLAR.

Evaluación de nuevas fuentes de antocianinas

Una vez establecido el método para la identificación de antocianinas aciladas se procedió a analizar otras fuentes de antocianinas presentes en materiales colectados en México, para estudiar cual es la mejor fuente de obtención de antocianinas aciladas para su uso en la industria de alimentos.

Cromatografía en capa fina

En la Figura 20 se muestra la CCF, en donde se pusieron tres controles de antocianinas aciladas: cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido (C36G); cianidina-3-O-glucósido (C3G) y pelargonidina-3-O-(6''feruloil-2''-glucósil)glucósido-5-glucósido, y trece muestras de extractos obtenidos de diferentes fuentes vegetales colectadas en México.

De acuerdo a este procedimiento por CCF las muestras que probablemente tienen antocianinas aciladas son la *Salvia mexicana*, toronjil, zebrina, ricino, eucalipto y maíz morado, ya que presentan un Rf igual o menor al que tiene la cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido, la cual representa a las antocianinas aciladas con ácidos alifáticos y un Rf menor a este indica: 1) la acilación de la antocianina o 2) la presencia de una antocianina di o tri glucósilada.

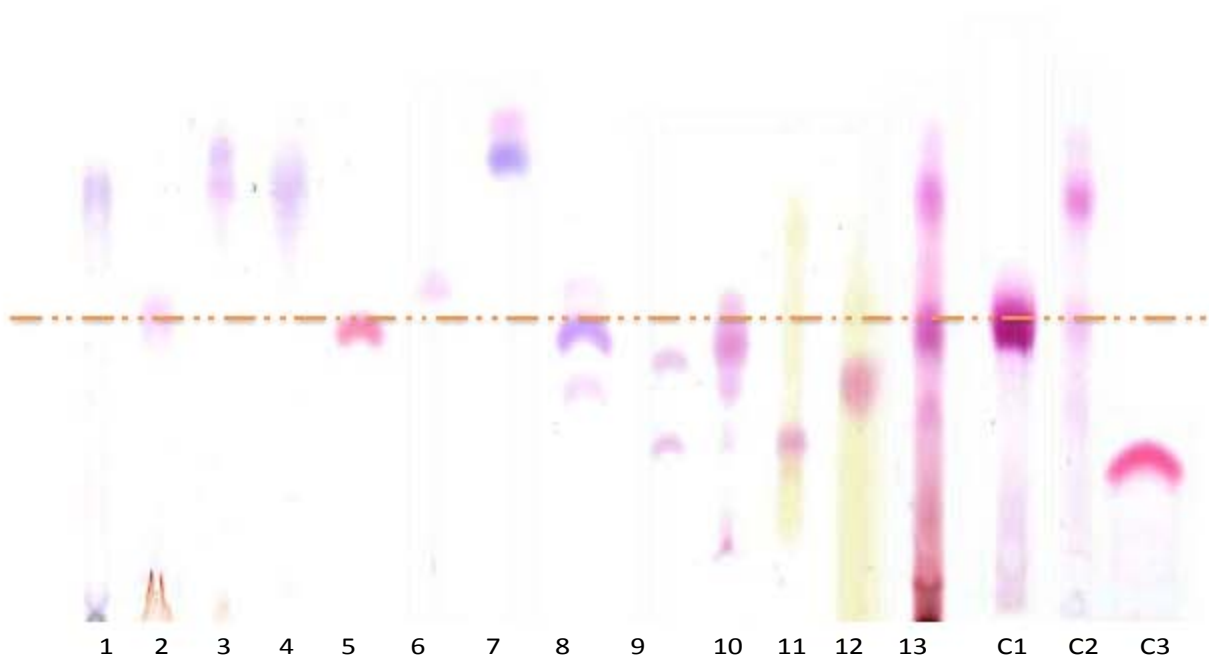


Figura 1. CCF de plantas analizadas. 1. Tiliapo, 2. Café, 3. Pingüica, 4. Pirul, 5. Colorín, 6. Trompetilla, 7. Bahuinia, 8. Salvia mexicana, 9. Zebrina, 10. Toronjil, 11. Ricino, 12. Eucalipto, 13. Maíz morado, C1. cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido, C2 cianidina-3-O-glucósido y cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido y C3. pelargonidina-3-O-(6''feruloil-2''-glucósil)glucósido-5-glucósido

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cromatografía de líquidos de alta resolución

Se analizaron las muestras por CLAR y los cromatogramas obtenidos se observan en el Cuadro 11, en donde se indica con una línea el minuto 6.5 en el que empiezan a eluir las antocianinas aciladas. Las muestras que presentaron tiempos de retención mayores a 6.5 min fueron: la *Salvia mexicana*, *Salvia hispanica*, zebrina y el maíz morado.




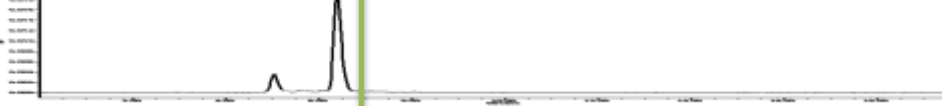
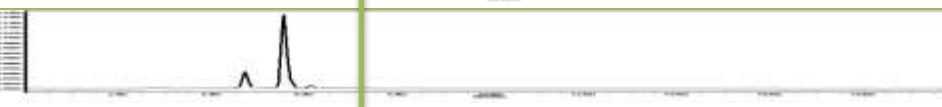
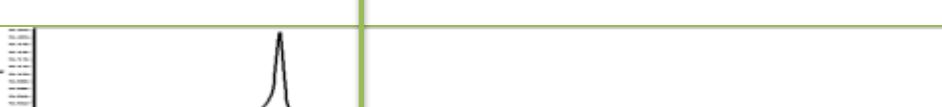

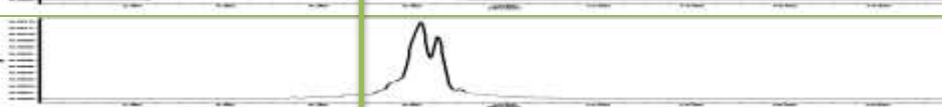





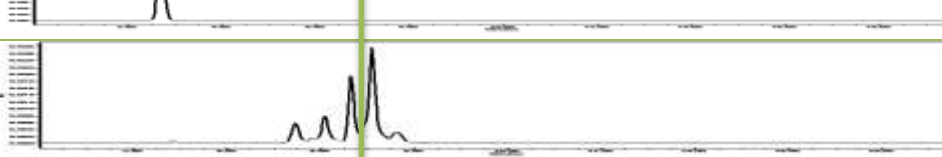
El extracto de antocianinas de las flores de *Salvia mexicana* presenta dos antocianinas con un tiempo de retención de 8.20 min y 8.43 min, lo que sugiere la presencia de ácidos hidroxicinámicos como agentes acilantes. Por otra parte; la zebrina presenta seis antocianinas y el tiempo de retención de las antocianinas mayoritarias es de 6.29 y 7.56 min. Por último, el maíz morado presenta tanto antocianinas aciladas como no aciladas de acuerdo a los tiempos de retención de 5.4 a 6.52 min, esto concuerda con lo obtenido por Yang en el 2010,³¹ el cual identificó las antocianinas del maíz morado cultivado en China y encontró seis antocianinas principales de las cuales 3 son no aciladas y 3 aciladas.

Cuantificación de antocianinas totales

Ya conociendo las muestras que contienen antocianinas aciladas es necesario evaluar su contenido total y así elegir cuales son las mejores fuentes de antocianinas aciladas. Los resultados del total de antocianinas se observan en el Cuadro 12 en donde se ve que el totomoxtle del maíz Cacahuacintle es el que presenta mayor contenido de antocianinas con 22.85 mg/g seguido del totomoxtle del maíz morado de Ixtenco con 18.30 mg/g, después con 15.39 y 16.38 mg/g se encuentra el olote del maíz Cacahuacintle y morado respectivamente. Con un contenido más bajo se encuentra la *Salvia mexicana* con 9.28 mg/g seguida del grano del maíz morado son 6.21 mg/g. Las muestras que presentaron un menor contenido son las hojas de ricino, eucalipto, toronjil, trompetilla, colorín y pirul con una concentración de antocianinas de 1.8 a 1 mg/g. Las muestras que presentaron una concentración menor a 1 mg/g fueron pingüica, tiliapo, café y zebrina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 11. Cromatogramas de las muestras analizadas

	tr	Cromatograma
Tiliapo	5.329	
Café	5.985	
Pingüica	4.749, 5.078	
Pirul	6.391	
Colorín	5.544	
Trompetilla	5.258	
Bahuinia	6.275	
Salvia mexicana	8.204	
Salvia hispanica	7.852	
Toronjil	5.309	
Zebrina	6.293 7.557	
Ricino	6.105	
Eucalipto	2.677	
Maíz morado	5.388 6.224 6.520	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 12. Antocianinas totales de fuentes vegetales analizadas.

Muestra	Antocianinas Totales mg/g <small>B.S.</small>
Tiliapo	0.28±0.01
Café	0.32±0.05
Pingüica	0.086±0.009
Pirul	1.03±0.04
Colorín	1.69±0.21
Trompetilla	1.69±0.08
Bahuinia	0.62±0.12
<i>Salvia mexicana</i>	9.28±0.28
<i>Salvia hispanica</i>	2.49±0.38
Toronjil	1.09±0.13
Zebrina	0.35±0.01
Hojas de Ricino	1.68±0.17
Hojas de Eucalipto	1.77±0.28
Maíz morado (grano)	6.21±1.23
Maíz Morado (olote)	16.38±2.35
Maíz Morado (totomoxtle)	18.30±0.45
Maíz Cacahuacintle (olote)	15.39±0.02
Maíz Cacahuacintle (totomoxtle)	22.85±1.51

En esta tercera etapa se determinaron las mejores fuentes de antocianinas aciladas las cuales son: el maíz morado de Ixtenco y Cacahuacintle y las flores salvias.

Obtención de los principales estándares: cianidina-3-O-glucósido y cianidina-3-O-(6''malonil)glucósido presentes en la cebolla morada

Se obtuvieron los estándares de la cianidina-3-O-glucósido (C3G), antocianina no acilada y cianidina-3-O-(6''malonil)glucósido (C36G), antocianina acilada, a partir de la cebolla morada. Estas antocianinas se encontraron en el maíz morado y con ayuda de los estándares se estudió su comportamiento durante el crecimiento del maíz.

Las estructuras de C3G y C36G se muestran en la Figura 21.

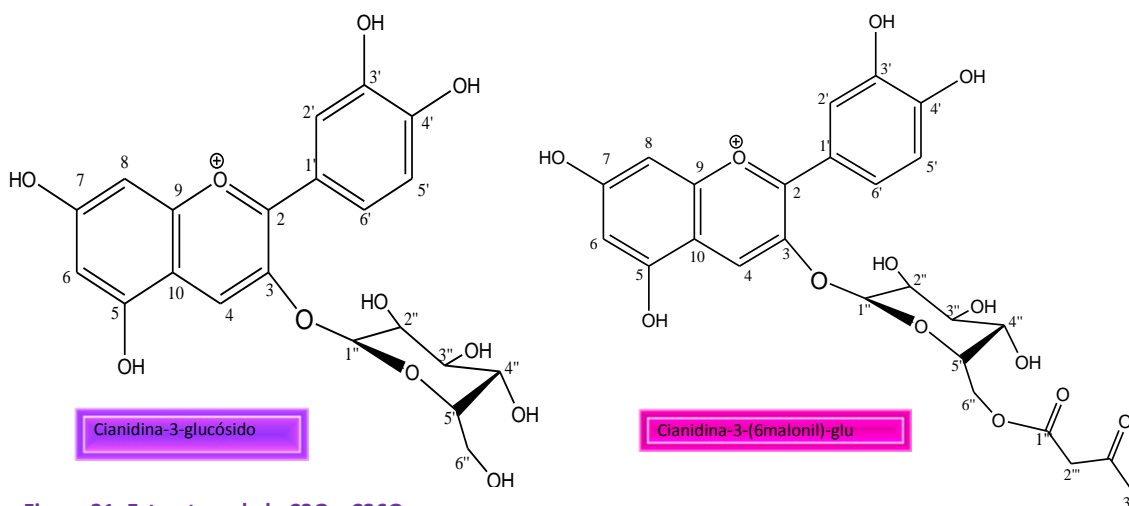


Figura 21. Estructura de la C3G y C36G

En el Cuadro 13 y 14 se muestran los datos de ^1H RMN y ^{13}C RMN de las antocianinas analizadas. El espectro de ^1H RMN presenta señales entre 3.13 a 5.39 ppm característicos de protones pertenecientes al glucósido y las 6.68-7.01 ppm característicos para sistemas aromáticos y alrededor de 8.82-9.01 ppm característica del protón del C4 los cuales son congruentes con los reportados por Fossen y colaboradores en el 2003.⁶⁰

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 13. ¹H RMN de la cianidina-3-glucósido y cianidina-3-(6''-malonil)glucósido

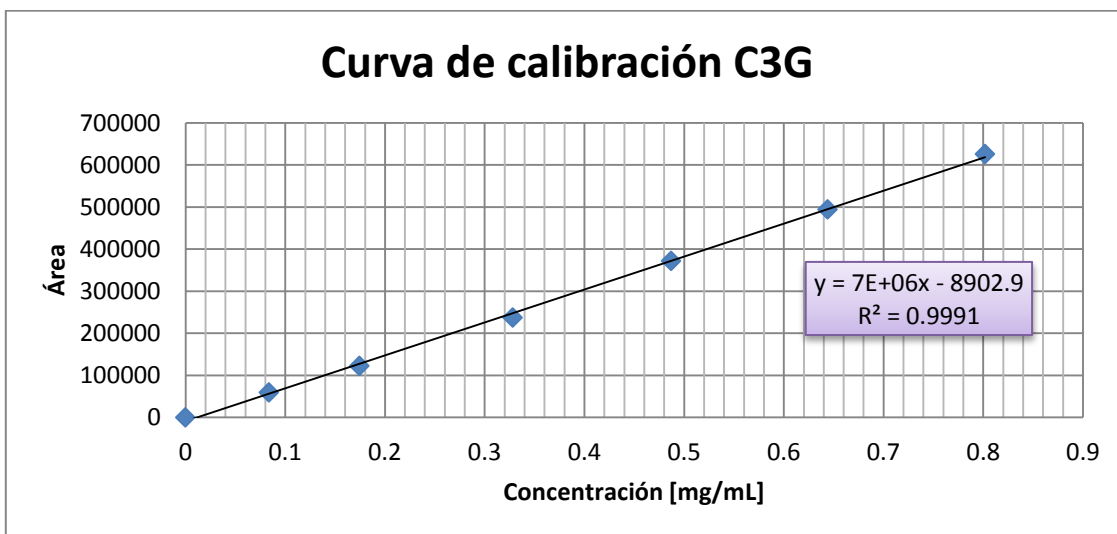
1H RMN (600 MHz CD ₃ OD)			
Posición		δ C3G	δ C36G
Aglicón	4	8.92 <i>s</i>	8.98 <i>s</i>
	6	6.65 <i>d</i> (1.9)	6.37 <i>d</i> (1.7)
	8	6.88 <i>d</i> (1.2)	6.85 <i>d</i> (1.9)
	2'	8.01 <i>d</i> (2.2)	8.01 <i>d</i> (2.3)
	5'	7.01 <i>d</i> (8.7)	7.00 <i>d</i> (8.7)
	6'	8.26 <i>dd</i> (8.7,2.2)	8.21 <i>dd</i> (8.8, 2.4)
Glucosa	1	5.26 <i>d</i> (7.8)	5.29 <i>d</i> (7.8)
	2	3.66-3.65 <i>m</i>	3.63-3.61 <i>m</i>
	3	3.32-3.30 <i>m</i>	3.58-3.57 <i>m</i>
	4	3.79-3.76 <i>m</i>	3.49 <i>dd</i> (12, 5.8)
	5	3.57-3.58 <i>m</i>	3.46-3.45 <i>m</i>
	6a	4.03 <i>m</i>	3.95-3.92 <i>m</i>
	6b	3.88-3.84 <i>m</i>	3.73 <i>dd</i> (12.1, 5.9)
Malonil		---	3.56 <i>s</i>

Cuadro 14. ¹³C RMN de la cianidina-3-glucósido y cianidina-3-(6''-malonil)glucósido

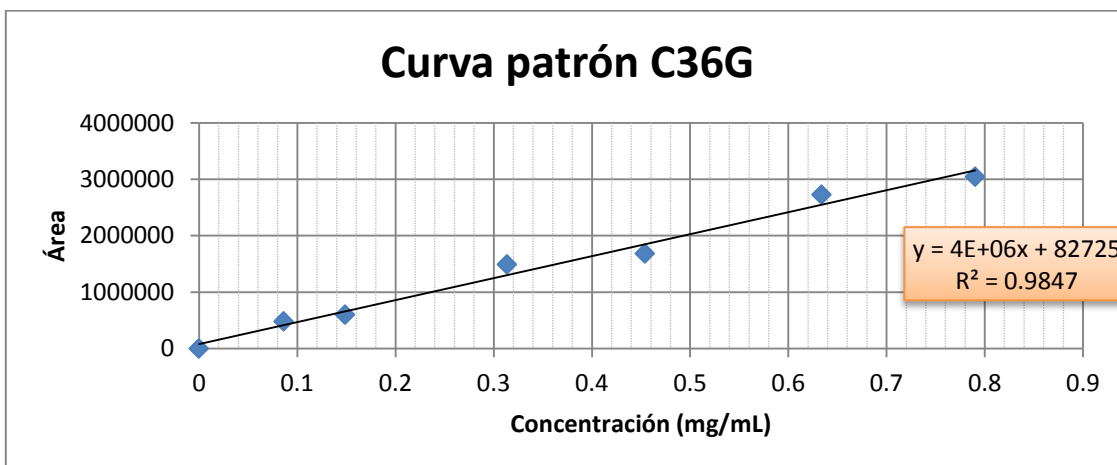
13C 600 MHz (150 MHz CD ₃ OD)			
Posición		δ C3G	δ C36G
Aglicón	2	--	158.35
	3	145.95	145.95
	4	136.97	132.68
	5	156.87	154.31
	6	102.8	101.74
	7	170.29	160.63
	8	96.86	93.38
	9	157.95	153.75
	10	114.11	112.20
	1'	119.96	120.26
	2'	118.34	116.54
	3'	148.17	146.66
	4'	--	156.64
	5'	116.02	116.96
6'	126.81	125.78	
Glicósido	1''	92.50	102.28
	2''	74.86	73.34
	3''	76.56	76.93
	4''	71.54	69.95
	5''	73.44	76.66
	6''	61.31	61.00
Malonil	1'''	--	175.96
	2'''	--	53.01
	3'''	--	167.49

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron las curvas de calibración en CLAR correspondiente a la C3G y C36G las cuales se presentan en las Gráficas 1 y 2, con el fin de evaluar el comportamiento de la concentración de antocianinas en diferentes etapas de crecimiento de los maíces estudiados.



Gráfica 1 Curva de calibración de cianidina-3-glucósido



Gráfica 2. Curva de calibración de cianidina-3-(6''malonil)glucósido

Antocianinas presentes en el maíz morado de Ixtenco y maíz cacahuacintle

Se cuantificó la concentración de antocianinas totales en tres estados de maduración y en las diferentes partes del maíz morado de Ixtenco (grano, olote y totomoxtle) y maíz cacahuacintle (olote y totomoxtle) para conocer cuando se produce la mayor cantidad de antocianinas aciladas.

Las antocianinas presentes en los maíces se identificaron por espectrometría de masas, posteriormente se analizaron antocianinas y fenoles totales con el fin de conocer la concentración total en los diferentes estados de maduración y por último, se analizó por CLAR la variación particular de antocianinas no aciladas (cianidina-3-O-glucósido) y aciladas (cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido en las etapas evaluadas.

Identificación de antocianinas por espectrometría de masas

El maíz morado de Ixtenco (grano, totomoxtle y olote) y el maíz cacahuacintle (totomoxtle y olote) contienen las mismas antocianinas, las cuales se presentan en el Cuadro 15 junto con su patrón de fragmentación con lo que se pudieron identificar a las antocianinas principales de estos maíces y que son la pelargonidina-3-O-glucósido (Pg3G), cianidina-3-O-glucósido (C3G), peonidina-3-O-glucósido (Pn3G), pelargonidina-3-O-(6''-malonil)glucósido (Pg36G), cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido (C36G) y peonidina-3-O-(6''-malonil)glucósido (Pn36G).

Cuadro 15. Valores de [M⁺]y patrón de fragmentación de las antocianinas encontradas en el maíz morado de Ixtenco y el maíz cacahuacintle

Antocianina	[M] ⁺	Fragmentos
Pelargonidina-3-glucósido	433	271
Cianidina-3-glucósido	449	287
Peonidina-3-glucósido	463	303
Pelargonidina-3-(6''-malonil)glucósido	519	433,271
Cianidina-3-(6''-malonil)glucósido	535	449,287
Peonidina-3-(6''-malonil)glucósido	549	463,303

El espectro presentado en la Figura 22 es representativo de los obtenidos para todas las muestras. Estos resultados son consistentes con los reportes para el maíz morado, uno de estos estudios es el realizado por Yang y colaboradores en el 2010 en donde caracterizó por espectrometría de masas las antocianinas del grano del maíz morado de China.³⁵ Otro estudio es el realizado por Jing y colaboradores en el 2007, el cual caracterizó las antocianinas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

presentes en el olote del maíz morado⁷, y por último Chung-Ying en el 2008 que analizó el totomoxtle del maíz morado.³⁶

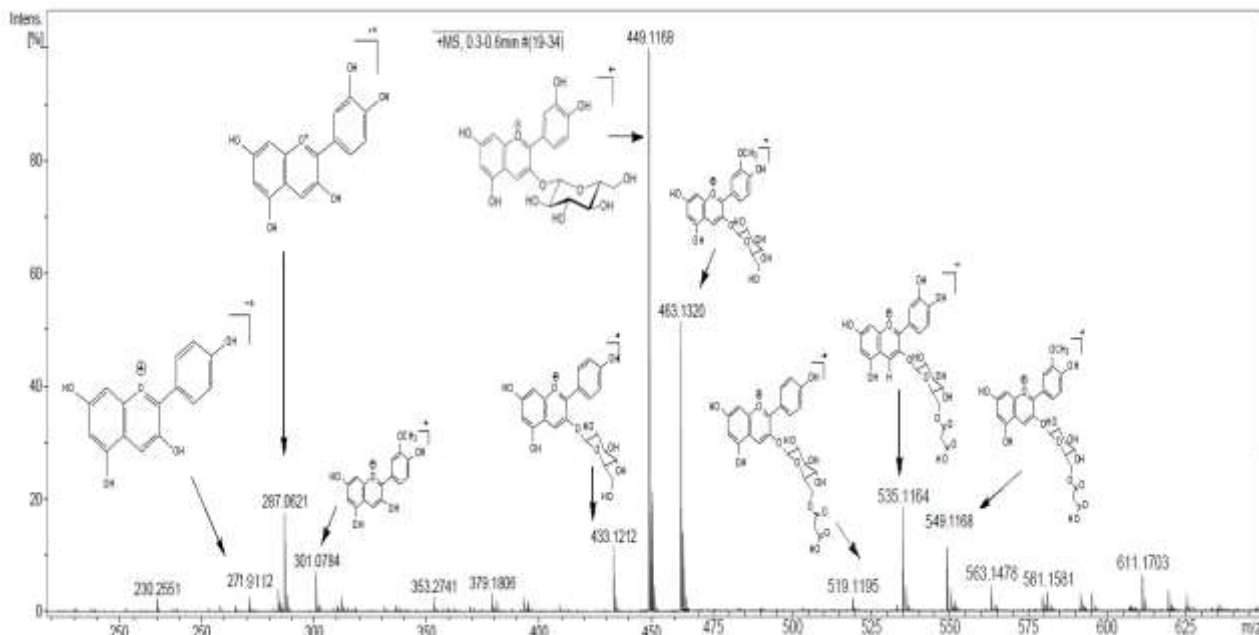


Figura 22. Espectro de masas (EM-ESI+; inyección directa) del extracto de olote del maíz morado

Antocianinas y fenoles totales presentes en las diferentes partes de los maíces

Maíz morado

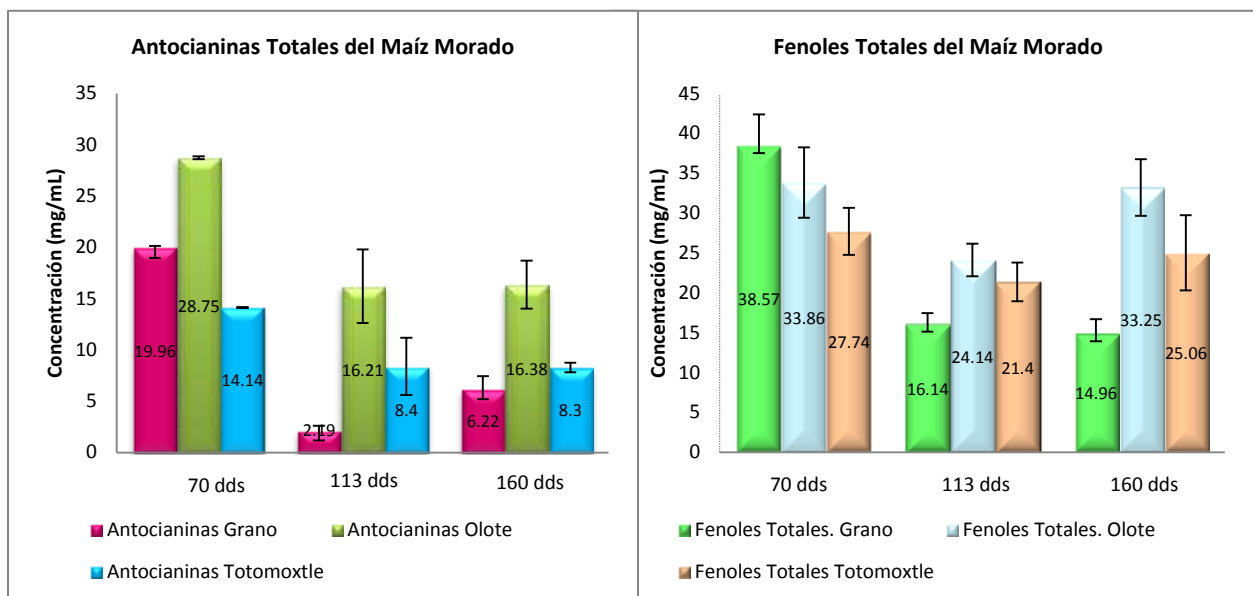
El maíz morado se estudio durante tres estados de madurez: 1) 70 días después de la siembra, 2) 113 dds y 3) 160 dds y se determinó la cantidad de antocianinas presentes en tres diferentes partes del maíz morado (grano, olote y totomoxtle). La concentración de antocianinas totales, obtenidas directamente del extracto metanólico, se presentan en el Cuadro 16, donde se puede observar que durante la primera etapa de crecimiento es cuando se produce la mayor cantidad de antocianinas.

En la gráfica 3 se muestran los resultados del análisis de antocianinas y fenoles totales en el maíz morado. El olote presenta la mayor concentración de antocianinas durante los tres tiempos evaluados (70,113 y 160), en donde en el tiempo uno (70) presenta la máxima concentración, seguido del tiempo dos (113) y se mantiene constante en el tiempo tres (160). Los fenoles presentaron el mismo patrón, sin embargo, en el tiempo tres los fenoles totales aumentaron a 33.2 mg/g.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 16. Antocianinas totales (mg/g) del maíz morado en diferentes etapas de madurez

	TIEMPO 1 (70 dds)	TIEMPO 2 (113 dds)	TIEMPO 3 (160 dds)
Grano	19.96±0.18	2.19±0.44	6.22±1.23
Olote	28.75±0.14	16.12±3.59	16.38±2.35
Totomoxtle	14.14±0.01	8.39±2.80	8.30±0.46



Gráfica 3. Antocianinas totales y fenoles totales del maíz morado

El grano presentó una mayor concentración de antocianinas a los 70 dds, sin embargo, para los 113 dds las antocianinas disminuyeron a 2.2 mg/g y a los 160 dds se obtuvieron 6.2 mg/g. Esto es debido a que en la primera etapa empieza a formarse la primera capa del grano (pericarpio) y conforme se va desarrollando se van sintetizando los compuestos del endospermo y germen.

La concentración de antocianinas en el totomoxtle disminuyó en la segunda etapa y permaneció constante en la tercera etapa de la misma forma que los fenoles totales. De manera general durante los primeros 70 días después de la siembra (dds) la planta sintetiza la mayor cantidad de antocianinas y fenoles totales y posteriormente esta disminuye.

Maíz Cacahuacintle

Por su parte, el maíz cacahuacintle contiene antocianinas en el totomoxtle y en el olote como se muestra en la Figura 23. La máxima concentración de antocianinas se presentó en la última etapa (160 dds) y el totomoxtle presentó una mayor cantidad de antocianinas y fenoles totales que el olote. En el Cuadro 17 se presentan los resultados obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

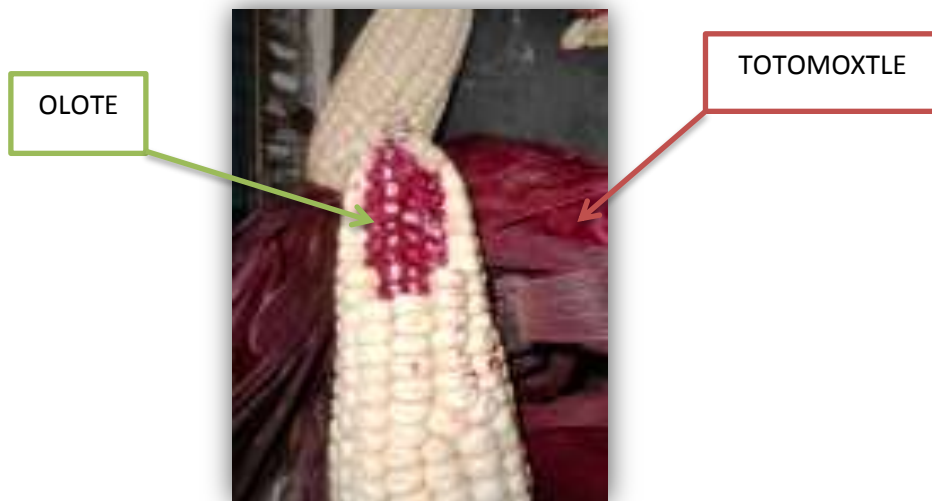
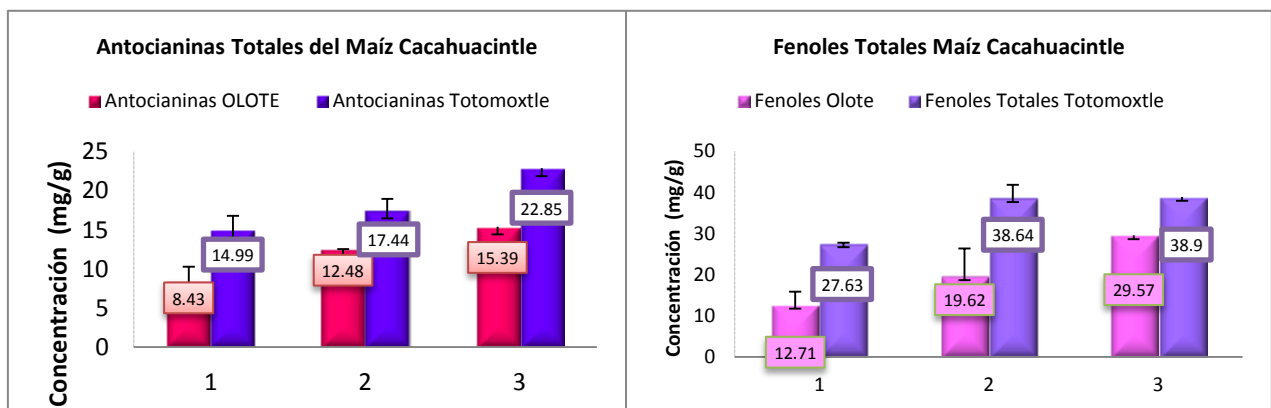


Figura 23. Maíz cacahuacintle

Cuadro 17. Antocianinas totales (mg/g) del maíz cacahuacintle en diferentes etapas de madurez

	1	2	3
Oloite	8.43±1.09	12.46±1.82	15.39±0.02
Totomoxtle	14.99±1.36	17.44±1.77	22.85±1.51

En el oloite se encontró un incremento gradual de antocianinas conforme se va desarrollando, los fenoles totales muestran la misma tendencia, sin embargo, el incremento en su concentración fue mayor.



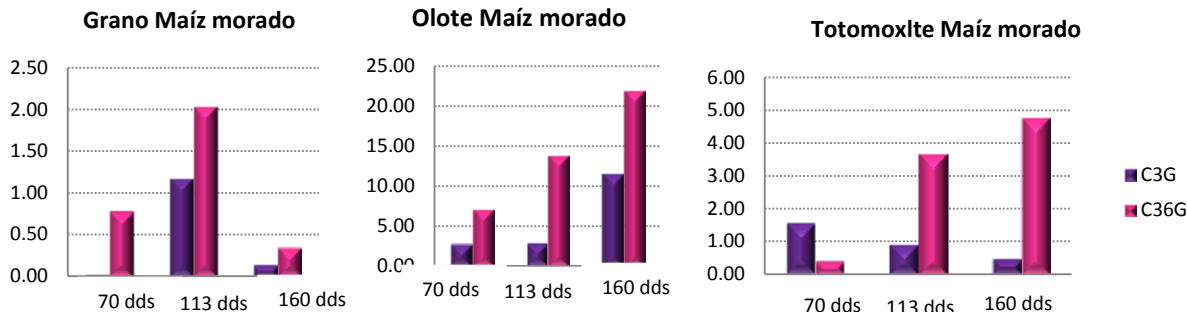
Gráfica 4. Antocianinas totales y fenoles totales del maíz cacahuacintle

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

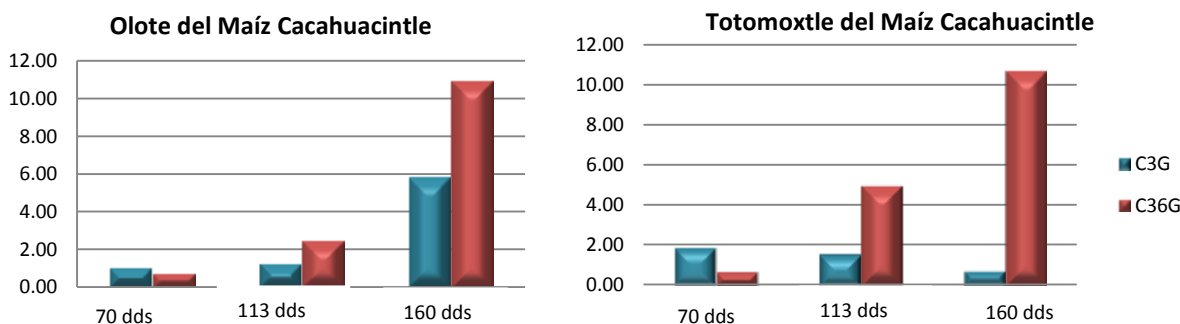
Análisis de antocianinas utilizando CLAR

Hasta el momento se ha evaluado la concentración de antocianinas totales, sin embargo, también se evaluó el perfil de antocianinas para determinar en qué momento de crecimiento se presenta la mayor concentración de antocianinas aciladas. Se cuantificaron únicamente las antocianinas más abundantes que son la cianidina-3-glucósido (C3G) y la cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido (C36G), la identificación de estas antocianinas en cada uno de los maíces se realizó comparando los tiempos de retención con los de los estándares obtenidos en la etapa anterior, de esta forma se calculó la concentración de cada antocianina en particular.

Los resultados se muestran en las gráficas 5 y 6, en donde se observa que en el caso del totomoxtle la C3G es la que se sintetiza a los 70 dds y conforme va madurando la C36G va incrementando su concentración y así, al final de la maduración la antocianina que predomina es la C36G, pero en el caso del olote, no se presenta este mismo patrón ya que la presencia de la C36G es mayoritaria desde el principio, esto puede deberse a que la síntesis de antocianinas en el olote empieza antes de los 30 días a diferencia del totomoxtle y del grano. Esto ocurre tanto en el maíz morado como en el Cacahuacintle.



Gráfica 5. Cuantificación de la C3G y C36G en el grano, olote y totomoxtle del maíz morado



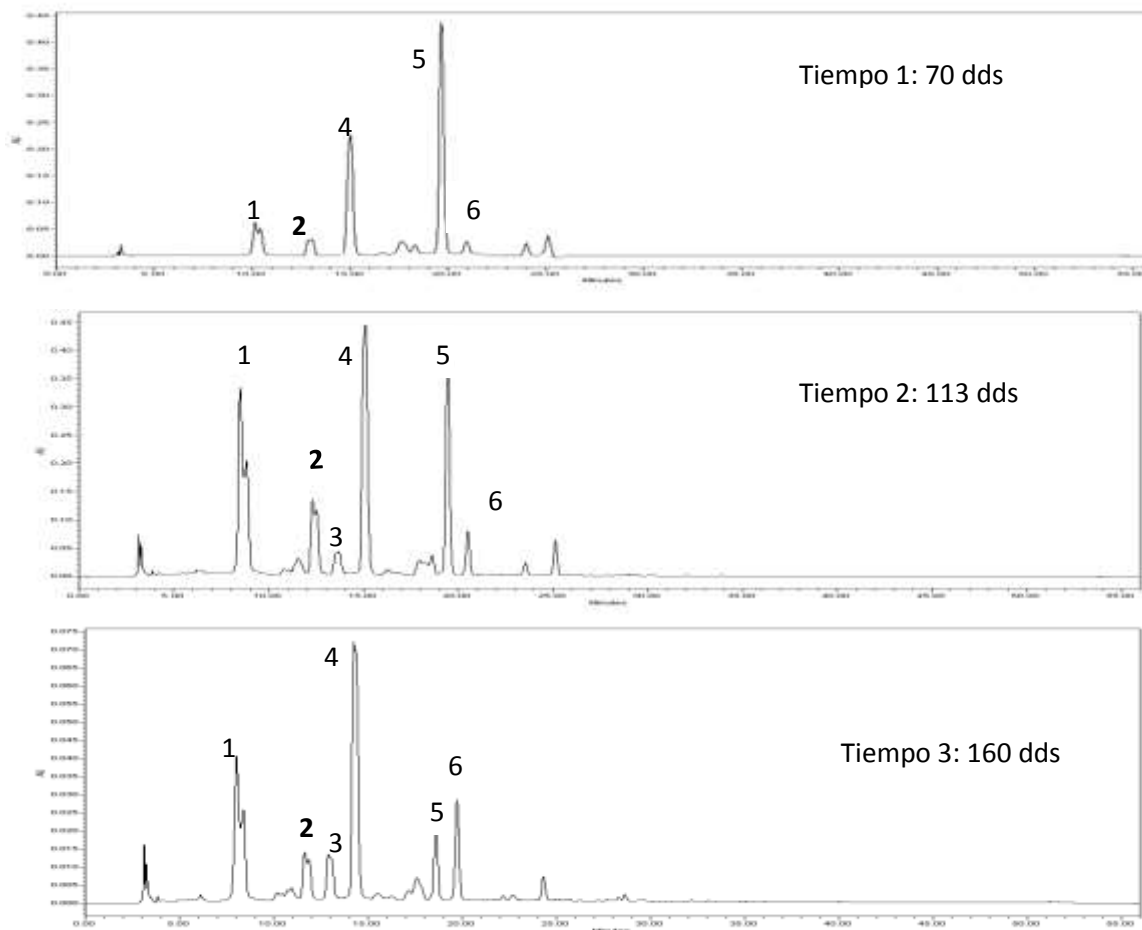
Gráfica 6. Cuantificación de la C3G y C36G en olote y totomoxtle de maíz cacahuacintle

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los cromatogramas presentados en el Cuadro 18, se observaron diferentes antocianinas, como la P3G, P36G, Pn3G y P36G. En los cromatogramas del extracto del grano de maíz morado se puede observar que a los 70 dds el perfil de antocianinas es más simple que el que se presenta en las siguientes etapas y se identificó el pico 1 como cianidina-3-glucósido, el pico 2 como pelargonidina-3-O-glucósido, el pico 3 como peonidina-3-O -glucósido, el pico 4 como cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido, el pico 5 como peonidina-3-O-(6''-malonil)glucósido y el pico 6 como pelargonidina-3-O-(6''-malonil)glucósido.

Cuadro 18. Cromatogramas del extracto de antocianinas presentes en el grano de maíz morado en diferentes etapas de maduración

Perfil de antocianinas del grano de maíz morado

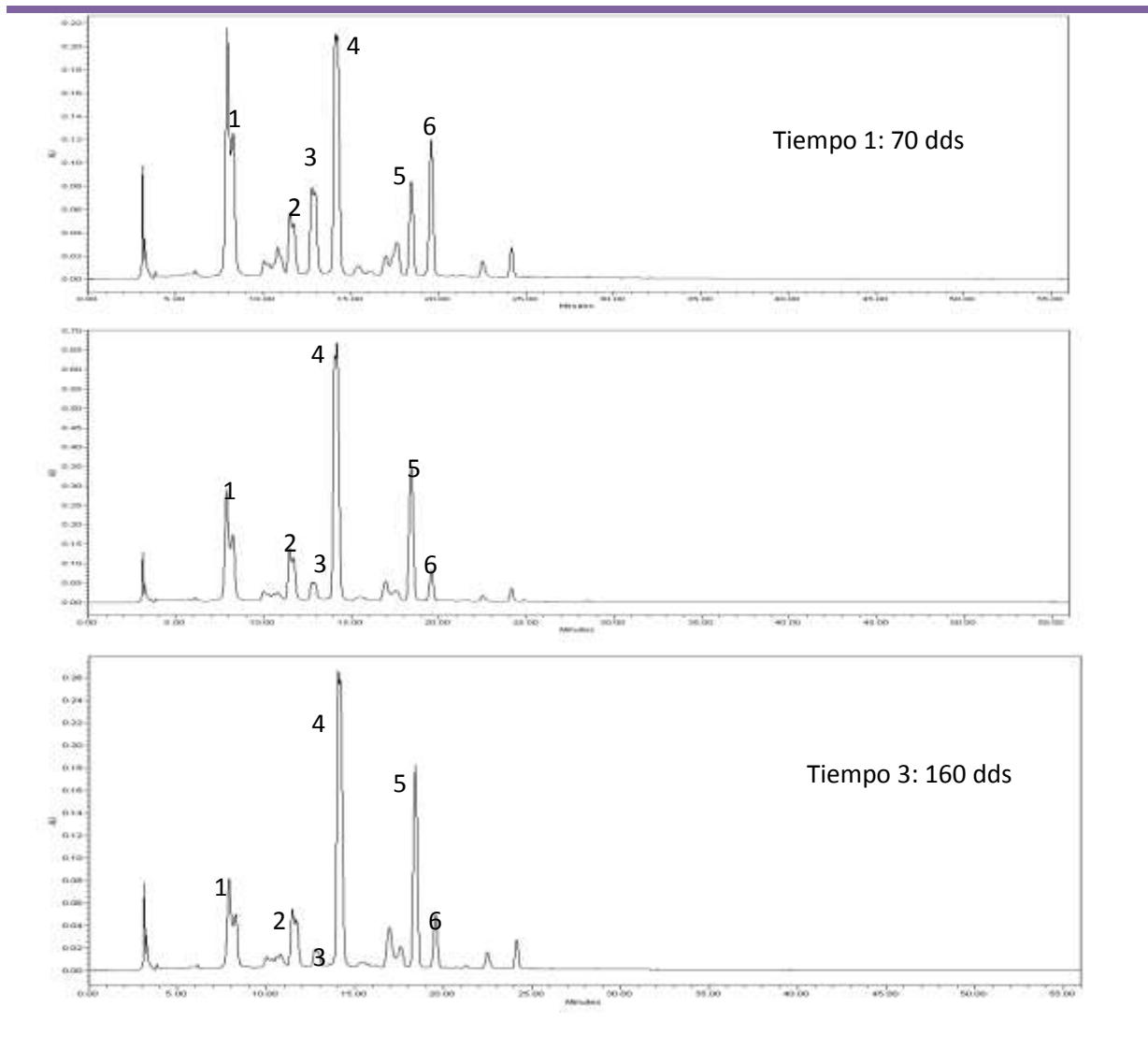


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el caso del olote de maíz morado se observa que en la primera etapa, el perfil de antocianinas es más complejo, se identificó el pico 1 como cianidina-3-glucósido, el pico 2 como pelargonidina-3-O-glucósido, el pico 3 como peonidina-3-O-glucósido, el pico 4 como cianidina-3-O-(6''-malonil)glucósido, el pico 5 como peonidina-3-O-(6''-malonil)glucósido y el pico 6 como pelargonidina-3-O-(6''-malonil)glucósido. A los 113 y 160 dds la diversidad de antocianinas es menor siendo la antocianina mayoritaria la C36G, la peonidina-3-O-(6''-malonil)glucósido esta considerablemente disminuida y la pelargonidina-3-O-(6''-malonil)glucósido se mantuvo constante. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Yang en el 2010.³¹

Cuadro 19. Cromatogramas del extracto de antocianinas presentes en el olote de maíz morado en diferentes etapas de maduración

Perfil de antocianinas del olote de maíz morado

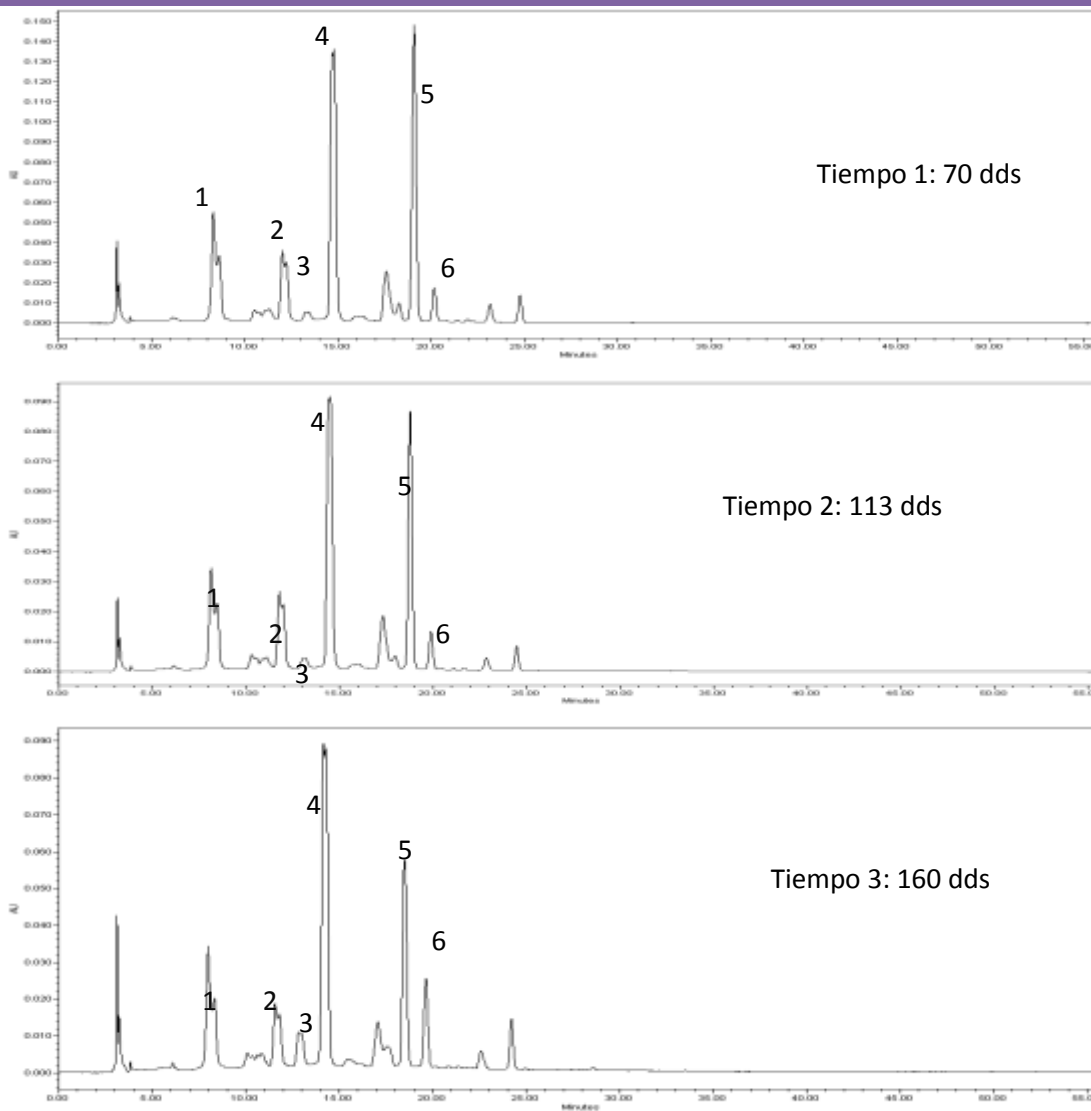


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el perfil de antocianinas del totomoxtle de maíz morado se observa el mismo número de antocianinas, sin embargo, la pelargonidina-3-O-(6''-malonil)glucósido (pico 5) va disminuyendo su concentración conforme va madurando.

Cuadro 20. Cromatogramas del extracto de antocianinas presentes en el totomoxtle de maíz morado en diferentes etapas de maduración

Perfil de antocianinas del totomoxtle de maíz morado



En resumen en esta etapa de evaluación de las antocianina aciladas presentes en los maíces morado y cacahuacintle se observó que el maíz cacahuacintle es el que presenta una mayor concentración de antocianinas. El estado de maduración con mayor contenido es el tiempo 3 (160 dds) y en el órgano en que se encuentran en mayor concentración es en el olote y la acilación es con el ácido malónico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antocianinas de las salvias

En esta etapa se evaluaron nueve flores de salvias originarias de México para determinar el tipo de antocianinas que contienen. Para lograr la identificación de las principales antocianinas se dividió esta etapa en cinco partes: 1) Cuantificación de antocianinas totales, 2) Detección del tipo de antocianidinas por CCF, 3) Determinación del perfil de antocianinas aciladas por CLAR, 4) Identificación de ácidos hidroxicinámicos por espectroscopía UV-VIS y 5) Caracterización de antocianinas por espectrometría de masas.

56

Antocianinas y Fenoles Totales

Los resultados de la cuantificación de fenoles y antocianinas totales se muestran en el Cuadro 21. Las salvias que presentan un mayor contenido de fenoles son la *Salvia hispanica* y *S. lineata* mientras que las salvias que presentan un mayor contenido de antocianinas totales son la *Salvia fulgens*, *S. lineata* y *S. mexicana* con una concentración de 20.41 mg/g 16.36 mg/g y 9.28 mg/g respectivamente.

Cuadro 21. Antocianinas totales y fenoles totales de salvias de México

MUESTRA	<i>Salvia purpurea</i>	<i>Salvia lineata</i>	<i>Salvia lasiantha</i>	<i>Salvia mexicana</i>	<i>Salvia leucantha</i>
					
POLIFENOLES TOTALES mg/g	39.52±0.55	56.04±3.23	44.04±1.10	42.22±3.51	36.49±1.17
ANTOCIANINAS TOTALES mg/g	4.18±0.26	16.36±0.19	1.85±0.42	9.28±0.28	7.35±0.39
	<i>Salvia polystachya</i>	<i>Salvia amarissima</i>	<i>Salvia hispanica</i>	<i>Salvia fulgens</i>	
					
POLIFENOLES TOTALES mg/g	36.60±2.02	40.52±1.55	80.85±2.79	45.34±0.79	
ANTOCIANINAS TOTALES mg/g	1.31±0.35	4.21±0.13	2.49±0.38	20.41±0.83	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cromatografía en capa fina

La cromatoplaqueta de los extractos de las flores de salvias realizada se muestra en la Figura 24. En donde la *S. lineata* y *S. fulgens* presentan una coloración roja lo cual indica la presencia de la pelargonidina, la *S. lasiantha*, *S. mexicana*, *S. purpurea* y *S. leucantha* presentan una coloración morada característica de la cianidina y la coloración azul presente en la *S. amarissima* y *S. hispánica* indica la presencia de la delfinidina.

La *S. lineata* presenta mínimo cuatro antocianinas y la *S. fulgens* presenta seis antocianinas con la estructura base de la pelargonidina. En la *S. lasiantha* se logran distinguir la presencia de dos antocianinas con la estructura base de la cianidina. La *S. amarissima* presenta cinco antocianinas derivadas de la delfinidina y cianidina. La *S. hispánica* presenta dos antocianinas mayoritarias derivadas de la delfinidina. La *S. mexicana* presenta tres antocianinas derivadas de la malvidina, peonidina o cianidina. Por último, la *S. leucantha* y *S. purpurea* presentan el mismo perfil de antocianinas las cuales pueden ser derivadas de la cianidina, malvidina o peonidina.

La variación de colores en las flores de las salvias se ha reportado por Saito en 1992, quien estudio las antocianinas de las flores de la familia Lamiacea y encontró una gran diversidad de antocianinas, desde delfinidina hasta pelargonidina.

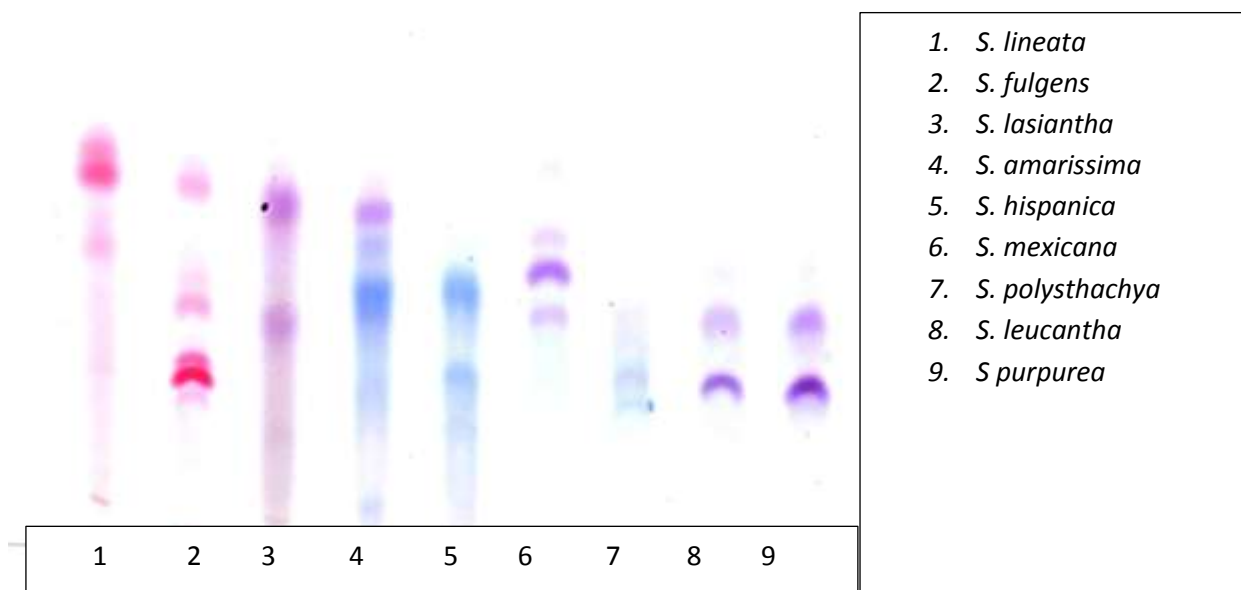


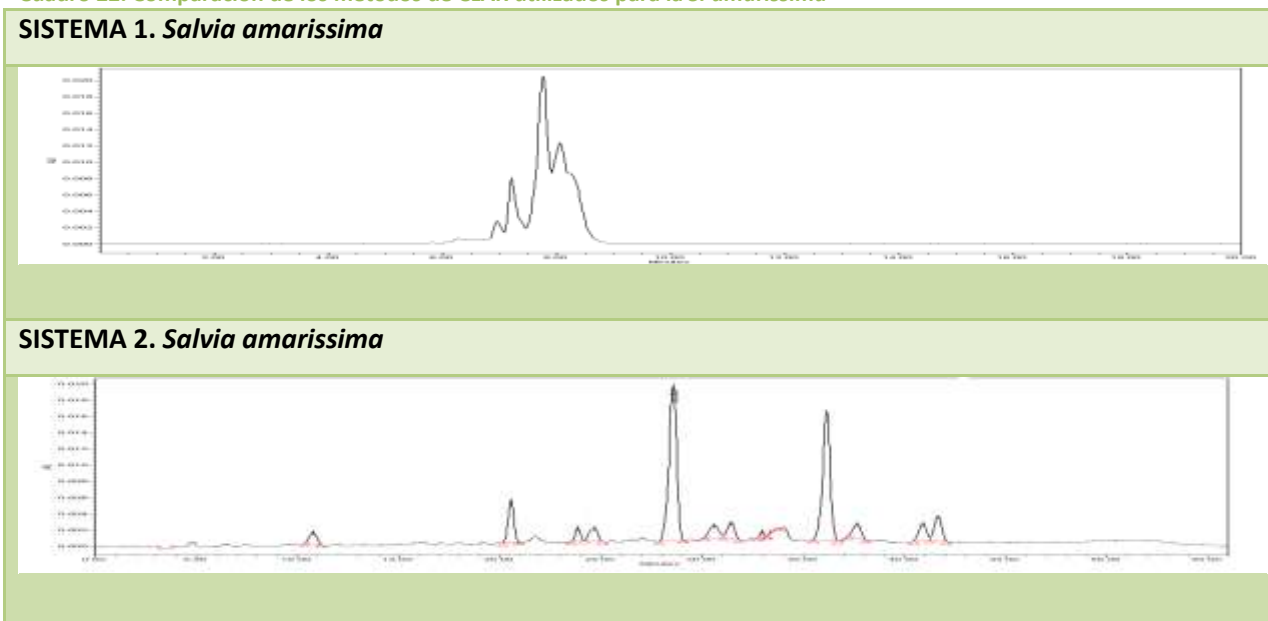
Figura 24. Cromatografía en capa fina de antocianinas de flores de salvias (Placa de sílica gel, eluyente: Butanol: ác. acético:agua 3:1:2)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de antocianinas utilizando CLAR

El análisis de las antocianinas extraídas de las flores de salvias por CLAR utilizando el SISTEMA 1 no fue el más adecuado porque presentó una baja resolución. Por esta razón fue necesario implementar otro método (SISTEMA 2) para obtener mejores resultados. El cromatograma obtenido con el SISTEMA 1 y el SISTEMA 2 se puede observar en el Cuadro 22, en donde se puede ver la diferencia de los dos sistemas utilizados.

Cuadro 22. Comparación de los métodos de CLAR utilizados para la *S. amarissima*



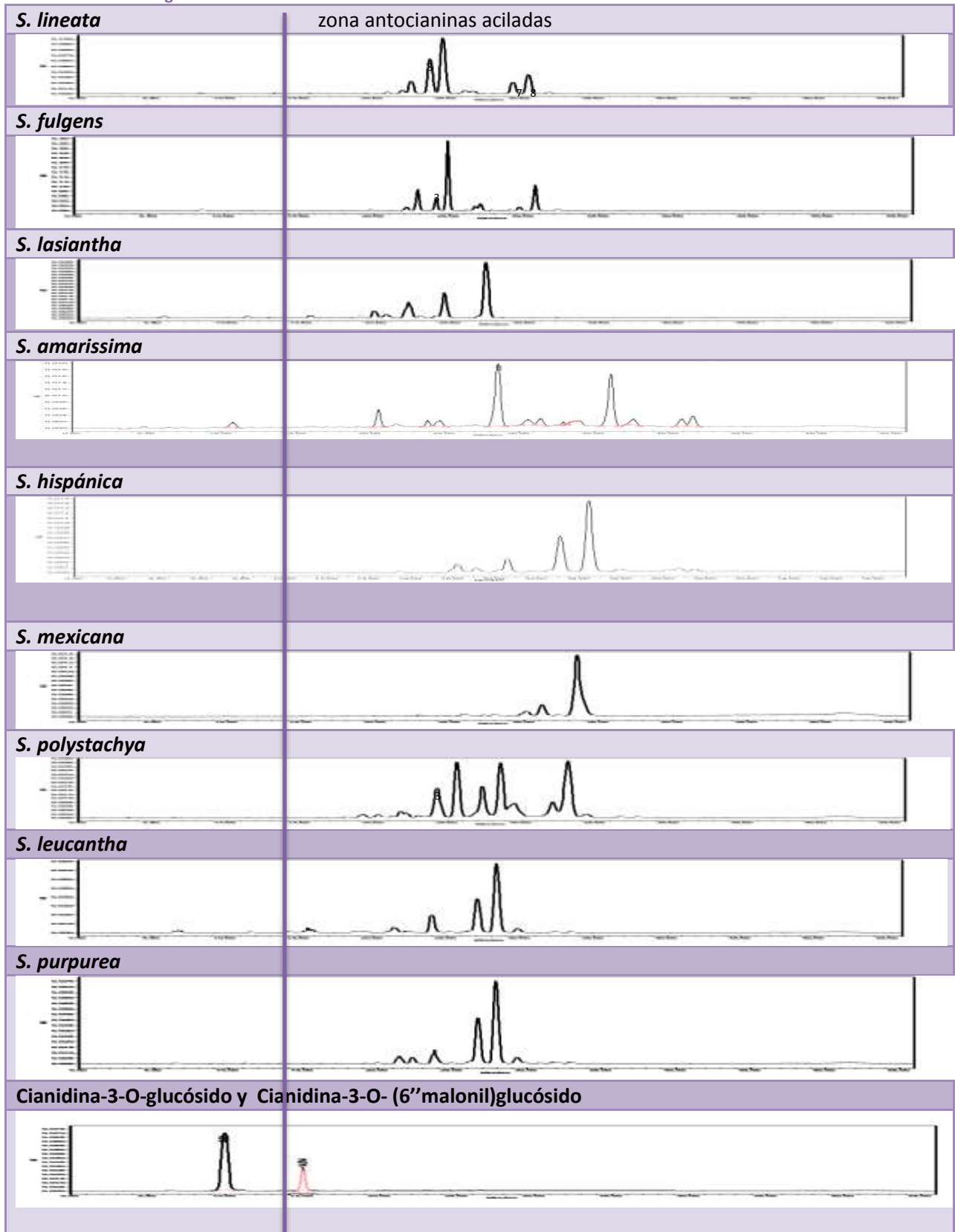
Una vez implementado el método, se realizó el análisis por CLAR de todos los extractos de antocianinas de salvias utilizando el SISTEMA 2. Se compararon estándares de antocianinas (C3G y C36G) y extractos de antocianinas de composición conocida para determinar el tiempo en el que empezaban a eluir las antocianinas aciladas, con base en esto se determinó que al minuto 15 empezaban a eluir.

Los cromatogramas de las antocianinas de las flores de salvias se presentan en el Cuadro 23, en donde se puede observar que las antocianinas contenidas en estas muestras aparecen después del minuto 15, esto sugiere que las flores de salvias presentan únicamente antocianinas aciladas, lo cual es congruente con lo reportado por Ishikawa en 1999, quien caracterizó las antocianinas de la *S. uliginosa* como antocianinas aciladas.⁹

La salvia que presentó un mayor número de antocianinas fue la *S. polystachya*, seguido de la *S. amarissima*, *S. lineata*, la *S. mexicana* presentó solo una antocianina mayoritaria.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 23. Cromatogramas del extracto de antocianinas de flores de salvia



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Espectroscopía UV-VIS

La espectroscopía UV-VIS fue una herramienta que dio evidencia de que las antocianinas presentes en las salvias estaban aciladas con ácidos hidroxicinámicos. Este análisis se realizó usando los extractos purificados y disueltos en metanol:HCl en una concentración de 0.2 mg/g y se hizo un barrido de 250 a 700 nm. Los resultados muestran que las antocianinas analizadas presentan ácidos hidroxicinámicos en por lo menos una de sus antocianinas. La absorción máxima de los extractos de salvias se muestran en el Cuadro 24 en donde se observa que todas las antocianinas de las flores de salvias presentan ácidos hidroxicinámicos en su estructura debido a un máximo de absorción en 320-370 nm, esto fue descrito por Harborne en 1958.⁷³

Cuadro 24. Máximos de absorción de los espectros de UV-VIS de los extractos de salvias

SALVIA	λ máx.	λ
<i>Salvia purpurea</i>	528	328
<i>Salvia lineata</i>	510	327
<i>Salvia lasiantha</i>	528	376
<i>Salvia mexicana</i>	535	364
<i>Salvia leucantha</i>	531	357
<i>Salvia polystachya</i>	535	355
<i>Salvia amarissima</i>	537	366
<i>Salvia hispanica</i>	537	355
<i>Salvia fulgens</i>	510	334

Espectrometría de masas

Tomando en cuenta que la *S. fulgens* presentó una concentración de antocianinas de 20 mg/g mayor a la obtenida de todas las salvias, se realizó el estudio por espectrometría de masas para esta muestra. Debido a la falta de tiempo, las otras salvias no se pudieron analizar en la misma forma que la *S. fulgens*. Sin embargo, se lograron identificar algunas antocianinas presentes en la *S. lasiantha*, *S. lineata*, *S. purpurea*, *S. amarissima* y *S. mexicana*.

Salvia fulgens

Para el análisis de las antocianinas presentes en la *Salvia fulgens*, se utilizó el método CLAR-DAD-IES⁺ usando como detector arreglo de diodos (DAD) y espectrometría de masas de trampa iónica con ionización por electrospray (EM-IES⁺). El extracto de las flores de la *S. fulgens* se hidrolizó con HCl 0.1N dejando reposar por 10 días. Se analizó la muestra sin hidrolizar y la muestra hidrolizada, para así lograr la identificación estructural de las antocianinas presentes en esta salvia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espectros obtenidos se muestran en la Figura 25, en donde las antocianinas presentes son mayoritariamente derivados de la pelargonidina, lo que concuerda con lo observado en CCF, la antocianina que eluye en 16 min presentó una m/z de 287, la cual corresponde a la cianidina.

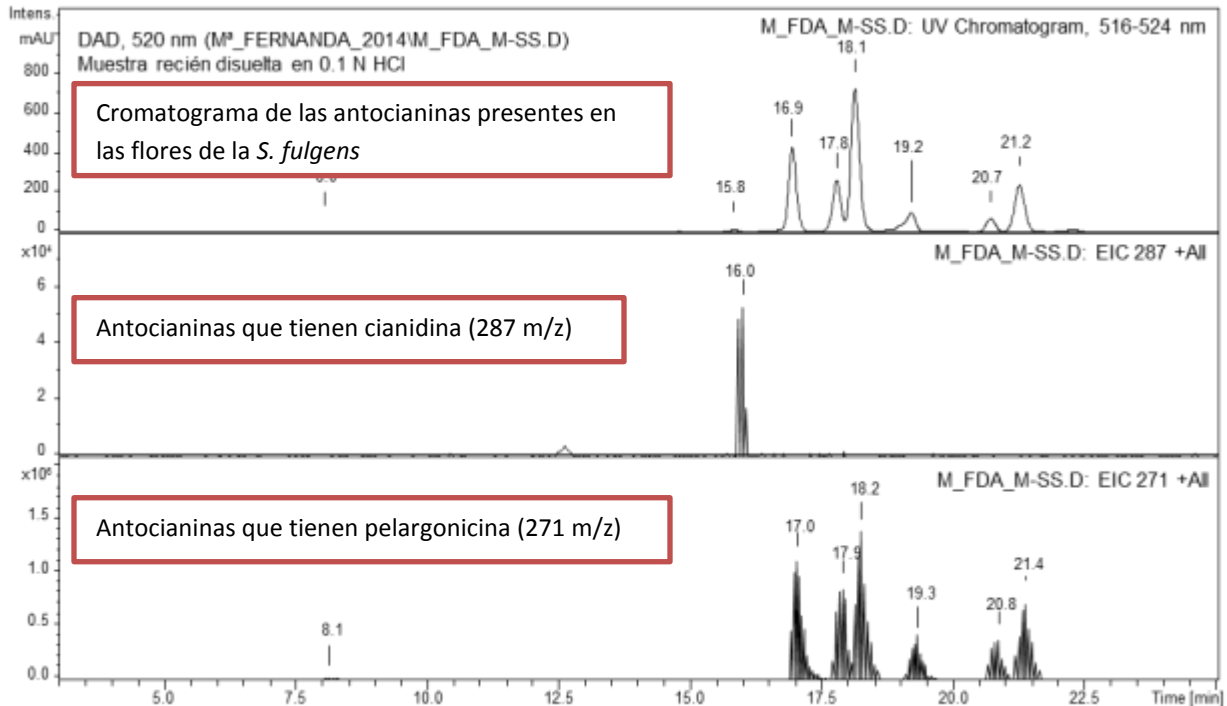


Figura 25. Cromatograma del extracto de las flores de *S. fulgens*

El cromatograma de la muestra hidrolizada (Figura 26) presenta un menor número de antocianinas y la presencia de la antocianina en el minuto 7.8 es el producto de esta hidrólisis.

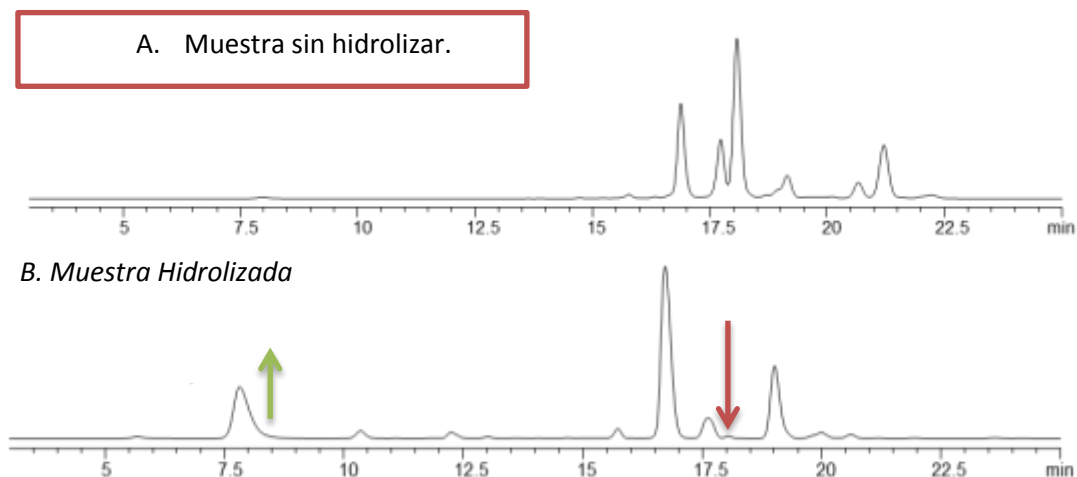
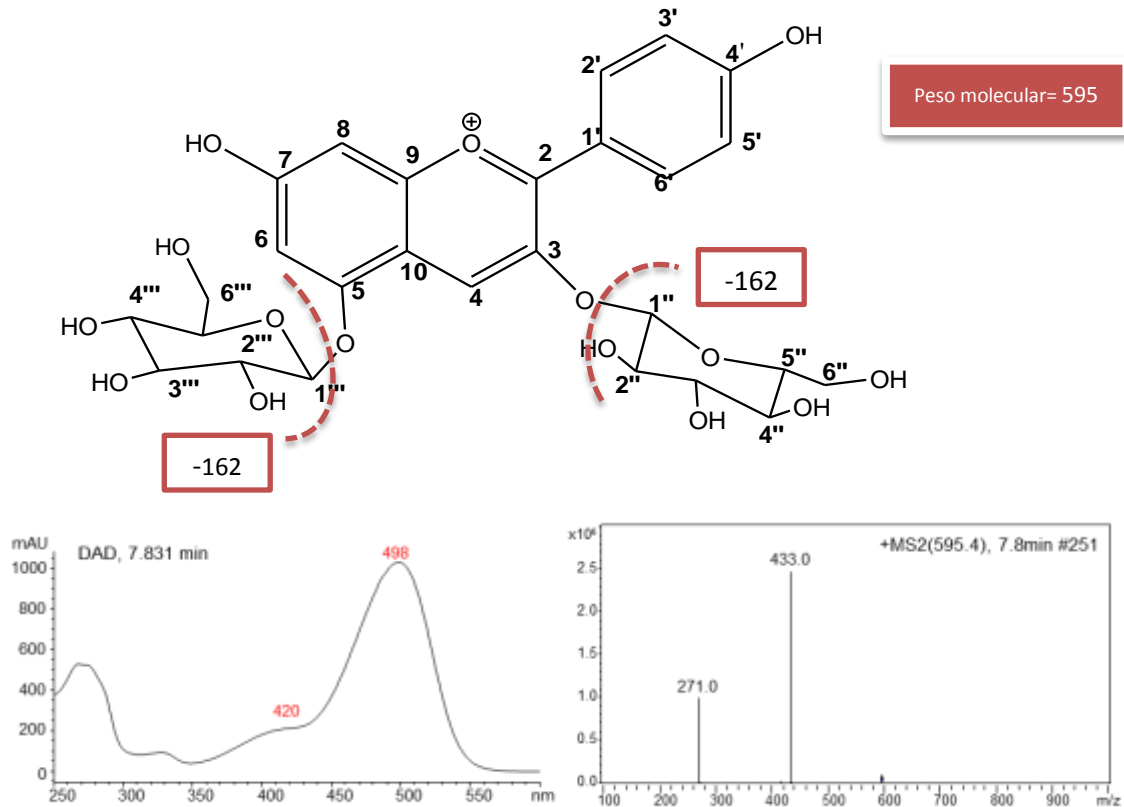


Figura 26. Cromatogramas de las antocianinas presentes en las flores de la *S. fulgens* de antocianinas hidrolizadas A) Muestra sin hidrolizar y B) Muestra hidrolizada

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestra hidrolizada

El producto de la hidrólisis de las antocianinas aparece en el minuto 7.8 y tiene un ion molecular de m/z 595. El espectro de MS/MS (Figura 27) muestra dos fragmentos producidos por pérdidas independientes y sucesivas de 162 uma, características de la pérdida de glucosa, por lo tanto se le asigna tentativamente la estructura de la pelargonidina-3,5-O-diglucósido y el espectro de UV-VIS corresponde a esta asignación.



62

Figura 27. Estructura propuesta, espectro de UV y espectro de MS/MS de la antocianina que eluye en 7.8 min, identificada como pelargonidina-3,5-O-diglucósido.

Los otros dos picos mayoritarios que se observan en el cromatograma de la muestra hidrolizada presentaron espectros de UV-VIS similares (Figura 28), debido a esto se propone que los compuestos que aparecen con tiempos de retención de 16.95 y 19.01 min son derivados de la pelargonidina como lo indica lo descrito por Harborne.⁷³

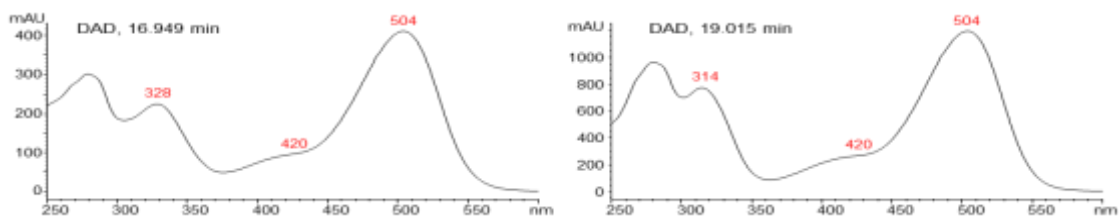


Figura 28. Espectro UV-VIS pico correspondiente al minuto 16.95 y 19.01

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muestra sin hidrolizar

Por otra parte, las señales que aparecen en el minuto 16.95 y 19.01 tienen un máximo de absorción en 328 nm y 314 nm respectivamente, esto se atribuye a la presencia de restos acilados pertenecientes al ácido cafeico y ácido *p*-cumárico. Los espectros MS² y MS³ mostrados en la Figura 29 confirman la pérdida de los restos acilados y la asignación tentativa para el compuesto eluido en 16.95 min es la pelargonidina-3-O-(6''-cafeoilglucósido)-5-glucósido y para el compuesto eluido en 19.01 min a la pelargonidina-3-O-(6''-*p*-cumaroilglucósido)-5-glucósido.

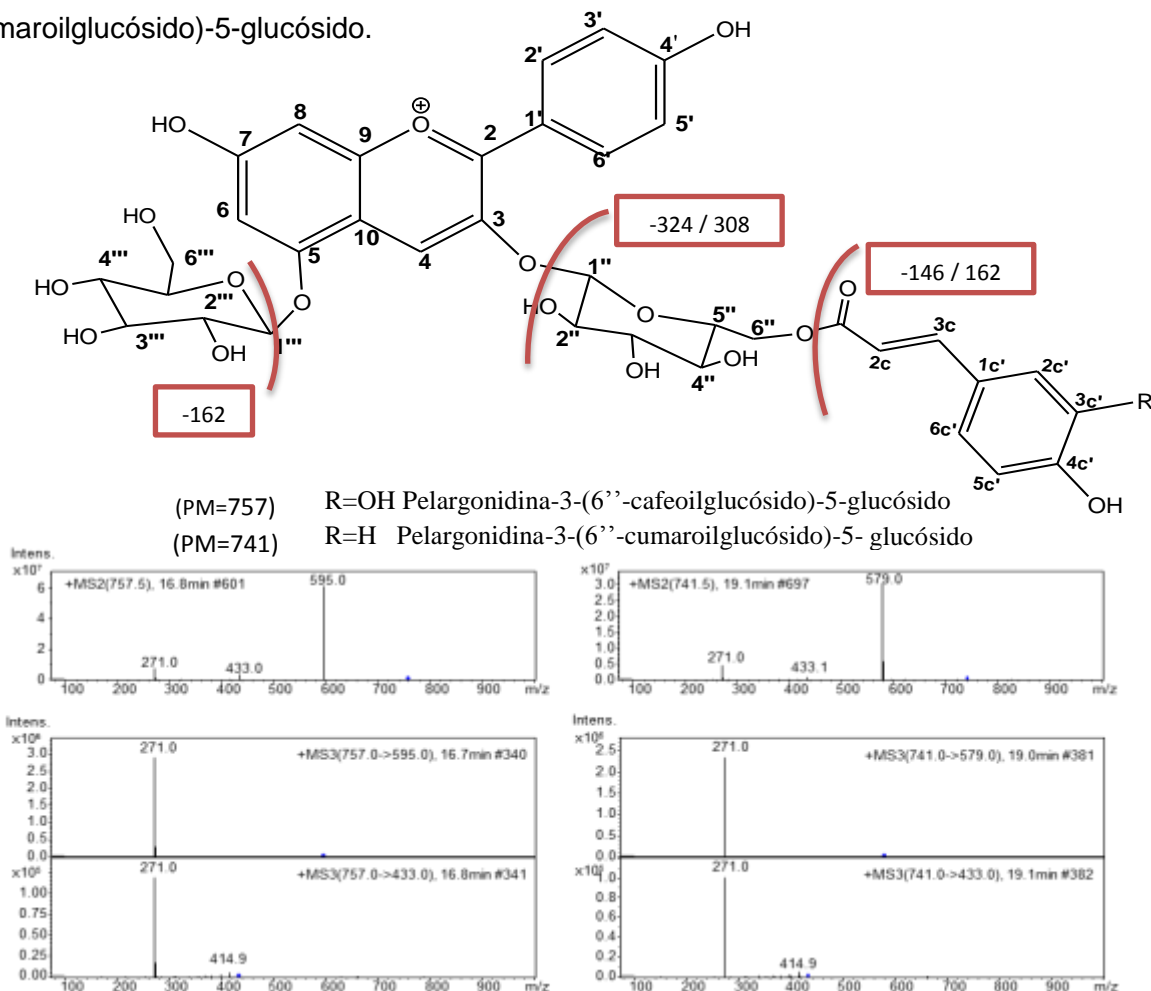


Figura 29. Espectro de MS² y MS³ para los compuestos eluidos en 16.95 y 19.01 min

Adicionalmente, en ambos compuestos hay una pérdida de 162 uma que se corresponde a la pérdida de una glucosa. En el espectro de MS³ se observa que la pérdida de los restos de cafeoilglucosa y de cumaroilglucosa, sin que la unión entre el resto acilo y la glucosa se fragmente y en ambos casos se obtiene un fragmento de m/z 271 que concuerda con la pelargonidina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las flores de la *Salvia fulgens*, las antocianidinas encontradas son pelargonidina (mayoritaria) y la cianidina que esta presente en menor proporción y está antocianina eluye a 15.8-16.0 min y se ha asignado como cianidina-3-O-(6''-cafeoilglucósido)-5-glucósido, con base al patrón de fragmentación mostrado en la Figura 30.

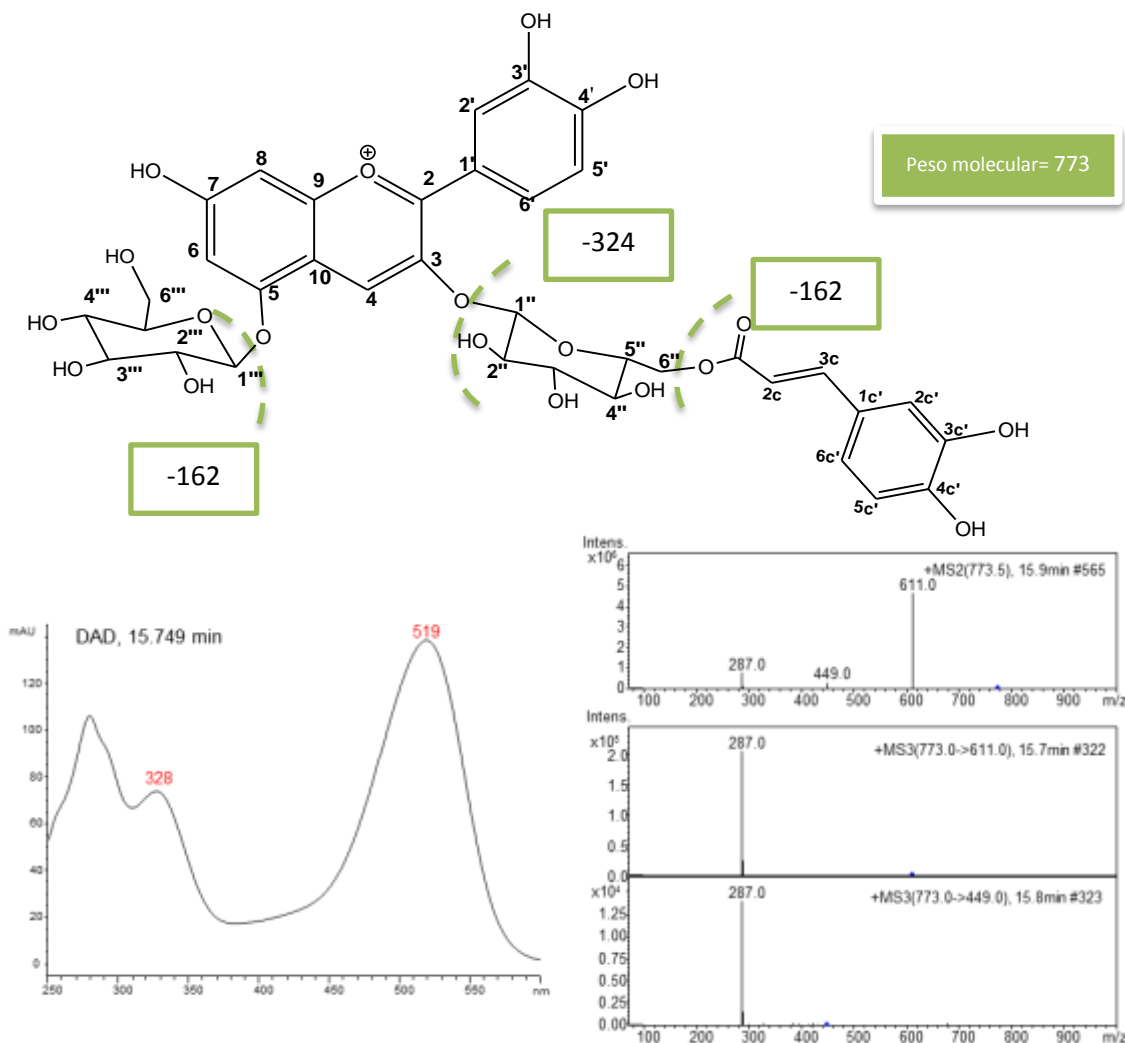


Figura 30. Estructura propuesta, espectro de UV-VIS y espectros de MS² obtenidos para la antocianina eluida a 15.8 min

Las cuatro antocianinas que aun no se han identificado y que aparecen en los minutos 17.8, 18.1, 20.7 y 21.2 minutos guardan una relación estructural con las antocianinas ya identificadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las antocianinas que aparecen a 17.8 y 18.1 min muestran el mismo espectro UV-VIS que el compuesto que eluye a 16.9 min (Figura 31), por lo que deben ser derivados del ácido cafeico de pelargonidina 3,5-O-diglucósido, lo cual es confirmado por su espectro de MS². (Figura 32A) También se observa un aumento en el peso molecular de 86 uma respecto al del compuesto que eluye a 16.9 min siendo m/z 757 para el compuesto que eluye a 16.9 min, 843 min para el compuesto que eluye a 17.8 min y m/z 929 para el compuesto que eluye a 18.1 min.

Por otro lado, los compuestos que aparecen en 20.7 y 21.2 min presentan unos espectros UV-VIS casi idénticos al del compuesto que eluye a 19.1 min (Figura 31), por lo que deben ser derivados del ácido *p*-cumárico de pelargonidina 3,5-O-diglucósido, y los fragmentos del espectro de MS² (Figura 32b) corresponden al residuo del ácido *p*-cumárico y del resto glucosídico, la diferencia en los compuestos que aparecen en 20.7 y 21.2 min es un aumento de 86 uma respecto al compuesto eluido a 19.1 min.

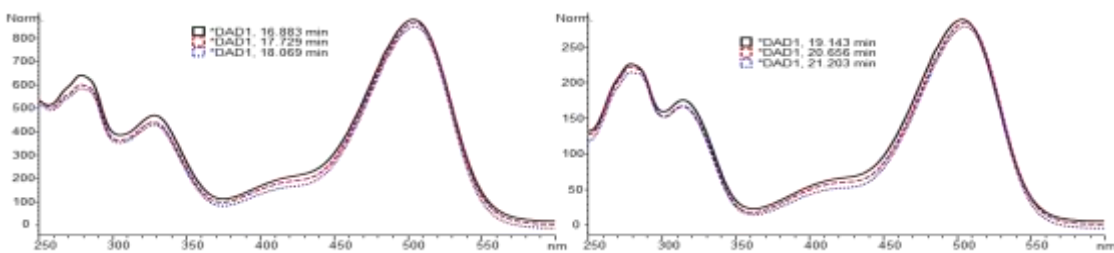


Figura 31. Espectros UV-VIS para las antocianinas aciladas presentes en la muestra no hidrolizada, en la cual se observan solo dos tipos de espectros de las 6 antocianinas analizadas

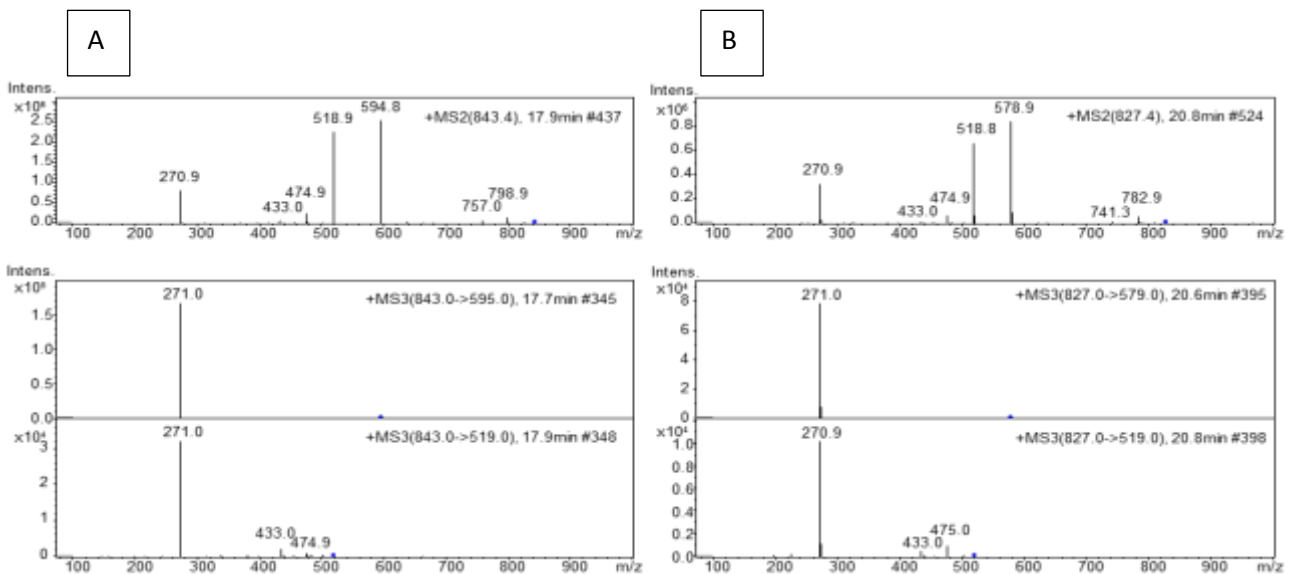


Figura 32. Espectros MS² y MS³ de *S. fulgens*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Además, las diferencias en los valores 86 una son compatibles con la pérdida de un grupo malonil, por consiguientes se propone que las antocianinas que aparecen en 17.8 y 18.1 min son compuestos derivados de pelargonidina-3-*O*-(6''-cafeoilglucósido)-5-glucósido aciladas con uno y dos sustituyentes malonil, respectivamente y las antocianinas eluidas en 20.8 y 21.1 min son derivados de pelargonidina-3-*O*-(6''-*p*-cumaroilglucósido)-5-glucósido, (Figura 33).

El análisis de los espectros MS² y MS³ revela que el patrón de fragmentación es el mismo en el caso de los derivados con un sustituyente malonil adicional (los compuestos que eluyen a 17.8 y 20.7 min, respectivamente), y la asignación tentativa que se hace de estas antocianinas es la de pelargonidina 3-(6''-cafeoilglucósido)-5-(6'''-malonilglucósido) para el compuesto que eluye a 17.8 min, y de pelargonidina 3-(6''-*p*-cumaroilglucósido)-5-(6'''-malonilglucósido) para el compuesto que eluye a 20.7 min.

Por otra parte, las antocianinas que presentan dos sustituyentes malonil se asignan como pelargonidina-3-*O*-(6''-cafeoilglucósido)-5-(4''',6'''-dimalonilglucósido) para el compuesto que eluye a 18.1 min, y de pelargonidina-3-*O*-(6''-*p*-cumaroilglucósido)-5-(4''',6'''-dimalonilglucósido) para el compuesto que eluye a 21.2 min, estos compuestos ya han sido reportados para otras flores de la familia de la Lamiacea por Saito⁷⁴ en 1992. No obstante es necesario determinar sus espectros de RMN para confirmar que las estructuras propuesta son las correctas.

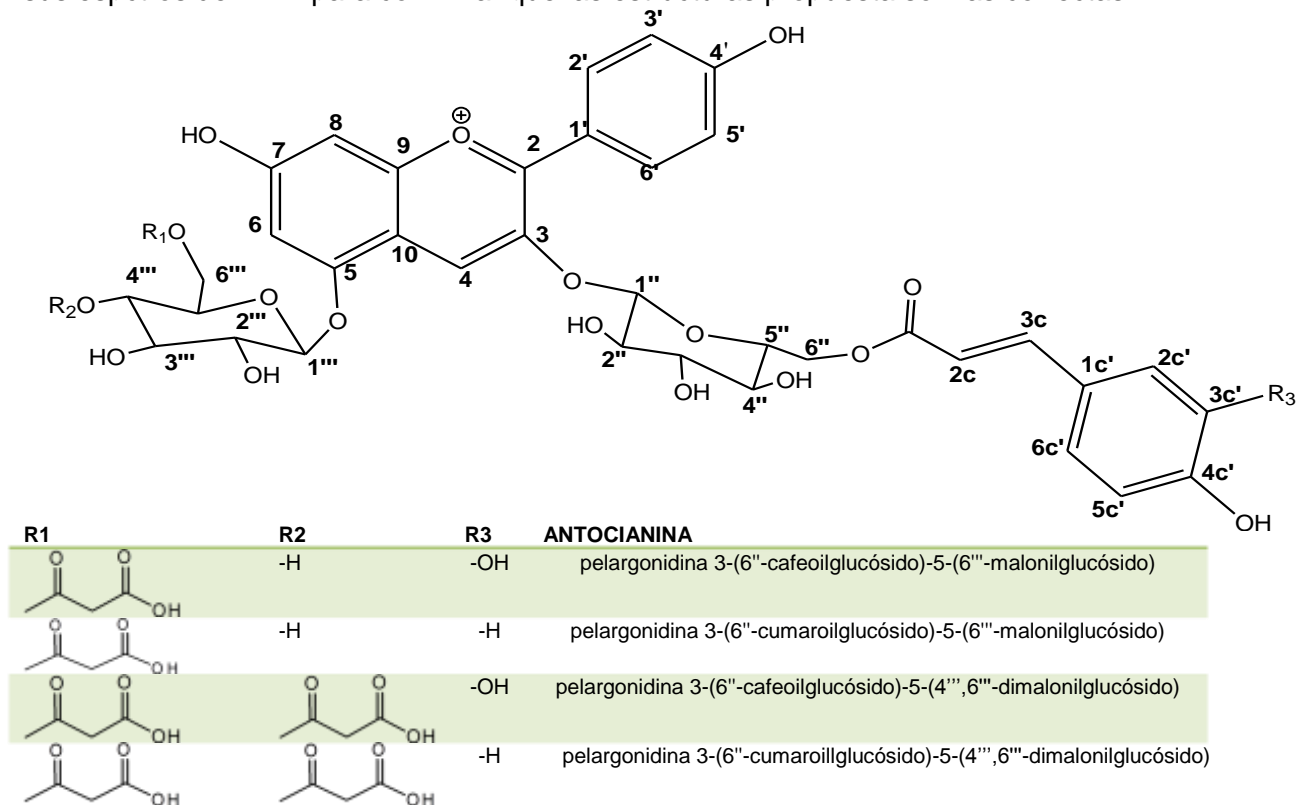


Figura 33. Derivados de la pelargonidina-3-*O*-(6''-*p*-cumaroilglucósido)-5-glucósido y pelargonidina-3-*O*-(6''-*p*-cafeoilglucósido)-5-glucósido

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

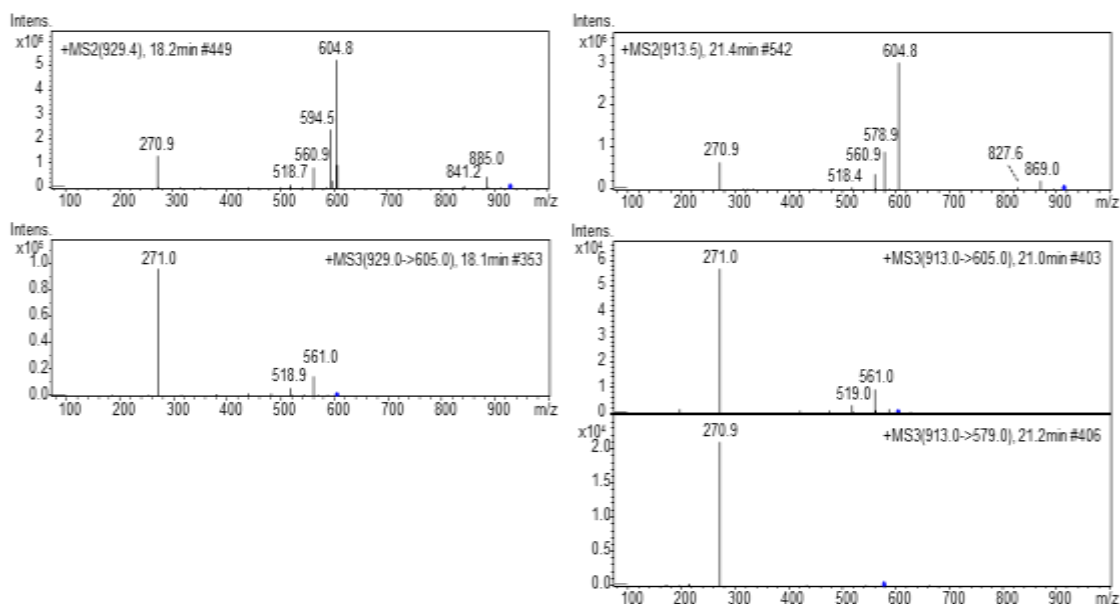


Figura 34. Espectros MS^2 y MS^3 de *S. fulgens*

En resumen, se aislaron seis antocianinas aciladas presentes en la *S. fulgens* cuyas estructuras tentativas son:

- pelargonidina-3-O-(6''-cafeoilglucósido)-5-(4''',6''')dimalonilglucósido
- pelargonidina-3-O-(6''-cumaroilglucósido)-5-(4''',6''')dimalonilglucósido
- pelargonidina-3-O-(6''-cafeoilglucósido)-5-(6''')malonilglucósido
- pelargonidina-3-O-(6''-cumaroilglucósido)-5-(6''')malonilglucósido
- pelargonidina-3-O-(6''cafeoilglucósido)-5-glucósido
- pelargonidina-3-O-(6''cumaroilglucósido)-5-glucósido.

Salvia lasiantha

En la Figura 35 se muestran los dos cromatogramas de las antocianinas presentes en las flores de la *S. lasiantha*; el primero corresponde a la muestra del extracto de flores sin hidrolizar de antocianinas en donde se observan 6 picos, mientras que el segundo cromatograma que corresponde a la muestra hidrolizada en este se presentó un pico en 5.7 min. La antocianina principal de la muestra hidrolizada tiene un ion molecular de m/z 611 cuya fragmentación fue m/z 449 [M-162], m/z 287[M-162-162], el cual corresponde a la cianidina-3,5-O-diglucósido y la antocianina minoritaria que aparece en 10.1 min corresponde a la cianidina-3-glucósido debido a que presentó un ion molecular de m/z 449 y un fragmento de m/z 287. En consecuencia con este análisis se pudo afirmar que la *S. lasiantha* contiene solo derivados de la cianidina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

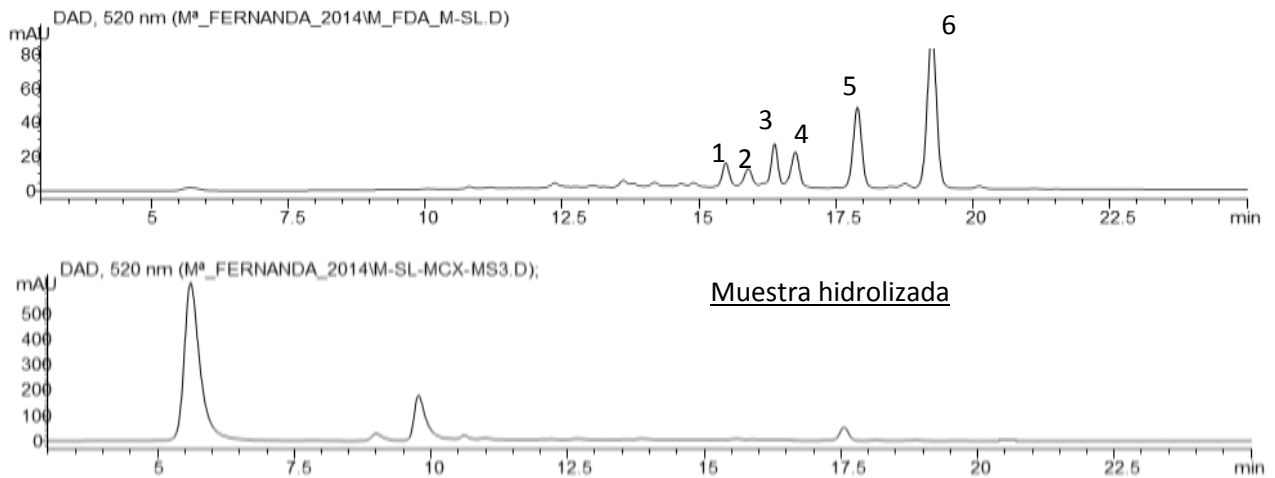


Figura 35. Cromatogramas de la *S. lasiantha* sin hidrolizar e hidrolizada.

Se analizó el extracto puro de las flores de la *S. lasiantha* el cual contiene seis antocianinas y las estructuras propuestas se presentan en el Cuadro 25. Las antocianinas eluidas a 15.5 y 17.9 min presentan el mismo patrón de fragmentación al igual que las eluidas a 15.9, 16.4 y 19.3 min, lo que sugiere que son isómeros, sin embargo, es necesario un estudio más detallado para conocer con precisión la estructura de cada uno de estos compuestos.

Cuadro 25. Identificación de antocianinas de *S. lasiantha*

Pico	tr (min)	[M] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)	Antocianina
1	15.5	757	595/449/287	Cianidina-3-O-(6''-p-cumaroilglucósido)-5-glucósido
2	15.9	773	611/449/287	Cianidina-3-O-(6''-cafeoilglucósido)-5-glucósido
3	16.4	843	595/535/449/287	Cianidina-3-O-(6''-p-cumaroilglucósido)-5-malonilglucósido
4	16.8	859	611/535/449/287	Cianidina-3-O-(6''-cafeoilglucósido)-5-malonilglucósido
5	17.9	757	595/449/287	Cianidina-3-O-(6''-p-cumaroilglucósido)-5-glucósido
6	19.3	843	595/535/449/287	Cianidina-3-O-(6''-cafeoilglucósido)-5-malonilglucósido

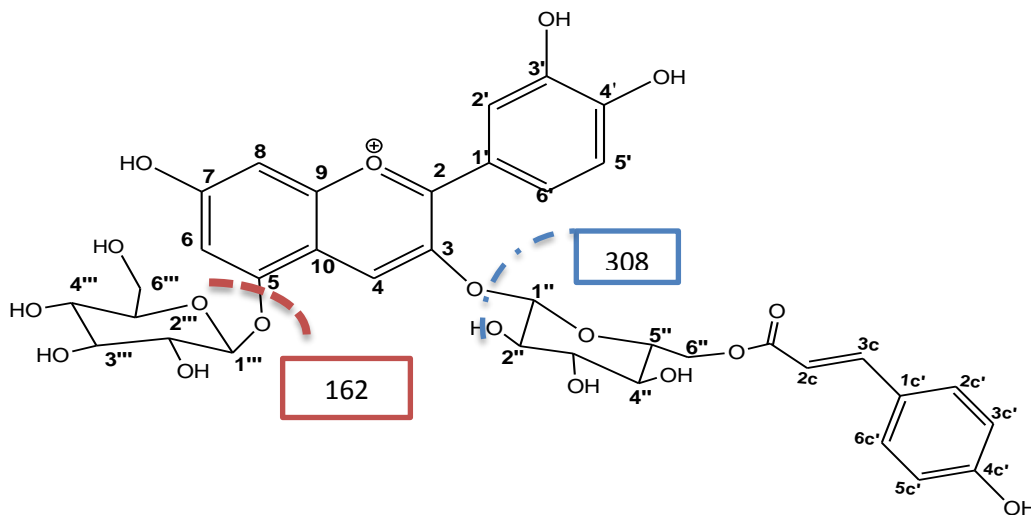


Figura 36. Estructura de la cianidina-3-O-(6''-p-cumaroilglucosil)-5-glucósido

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Salvia lineata

En el caso de la *S. lineata*, se analizó el extracto de antocianinas de las flores de la *S. lineata* por espectrometría de masas utilizando la técnica de electrospray por inyección directa. Se realizó el análisis con un extracto de antocianinas purificado del cual se disolvió 1 mg en metanol para su estudio.

Las antocianinas identificadas en esta salvia se presentan en el Cuadro 26, en donde se observan tres antocianinas con una estructura base de pelargonidina y una antocianinas con una estructura base de cianidina.

Cuadro 26. Identificación de antocianinas de *S. lineata*

[M] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)	Antocianina
929	843/757/595/449/287	Cianidina-3-O-(6''-cumaroilglucósido)-5-(4''',6'''-dimalonilglucósido)
843	595/519/271	Pelargonidina-3-O-(6''-cafeoilglucósido)-5-(6''''malonilglucósido)
757	595/433/271	Pelargonidina-3-O-(6''-cafeoilglucósido)-5-glucósido
595	433/271	Pelargonidina-3,5-O-diglucósido

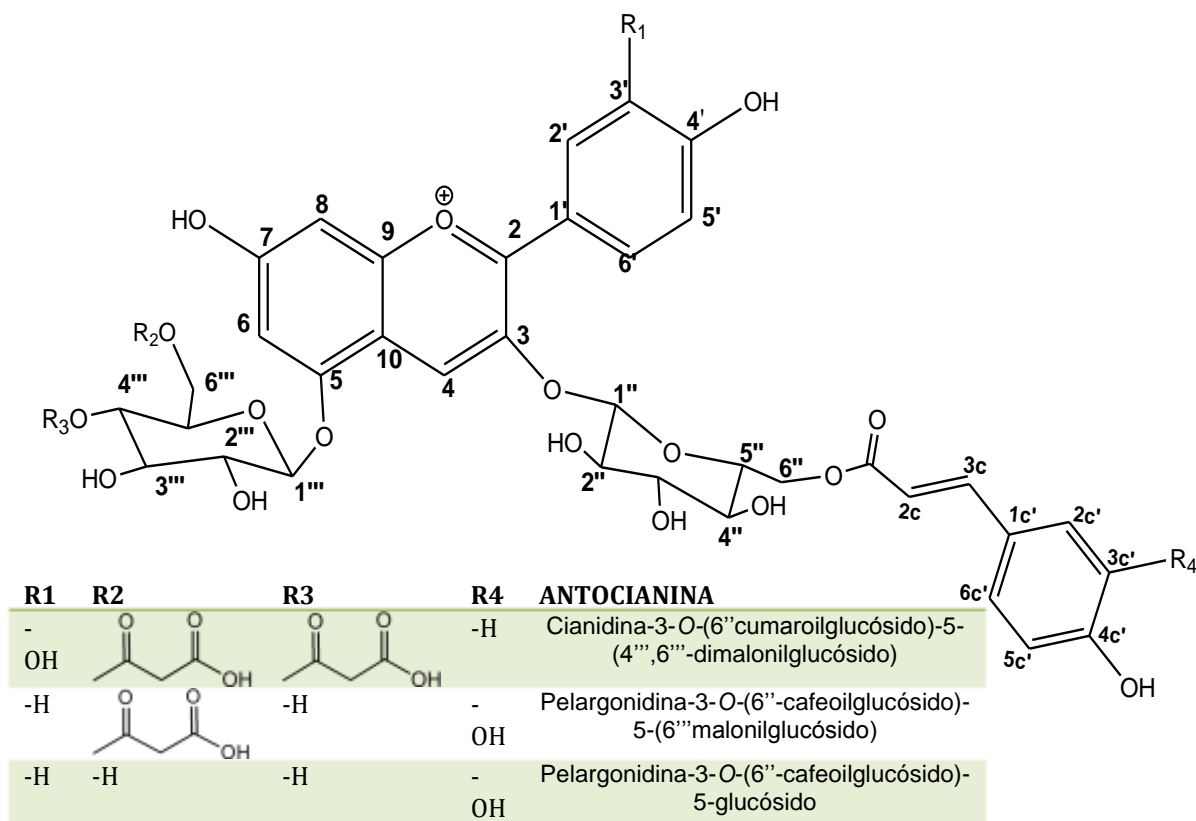


Figura 37. Antocianinas encontradas en la *S. lineata*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Salvia purpurea, *S. amarissima* y *S. mexicana*

El extracto de las flores de las *S. purpurea*, *S. amarissima* y *S. mexicana*, se analizaron por espectrometría de masas utilizando la técnica de electrospray por inyección directa modo positivo.

La identificación se realizó en base de su patrón de fragmentación y en el Cuadro 27 se muestra una propuesta tentativa de las las antocianinas presentes en estas muestras.

Cuadro 27. Identificación de antocianinas de *S. purpurea*, *S. amarissima* y *S. mexicana*

[M] ⁺ (m/z)	MS/MS (m/z)	Antocianina
<i>S. purpurea</i>		
757	595/449/287	Cianidina-3-O-(6''- <i>p</i> -cumaroilglucósido)-5-glucósido
843	595/535/449/287	Cianidina-3-O-(6''-cafeoilglucósido)-5-malonilglucósido
<i>S. amarissima</i>		
433	271	Pelargonidina-3-O-glucósido
579	331	Malvidina-3-O-(6''malonil)glucósido
<i>S. mexicana</i>		
801	639/493/331	Malvidina-3-O-(6''- <i>p</i> -cumaroil)5-glucósido

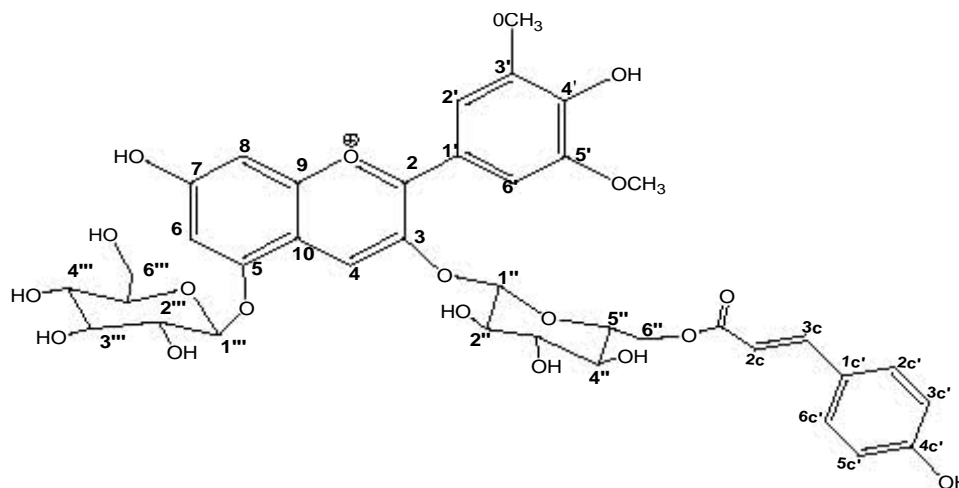


Figura 38. Propuesta de la antocianina mayoritaria de la *S. mexicana*

Adicionalmente se propone que la antocianina responsable del color de la flor se la *S. mexicana* es la malvidina-3-O-(6''-*p*-cumaroil)5-glucósido en base a su patrón de fragmentación, no obstante es necesario realizar un estudio más detallado.

En resumen, las salvias que tienen un color morado en sus flores presentan derivados principalmente de la cianidina y malvidina y en menor proporción derivados de la delphinidina y pelargonidina, y las salvias que tiene flores rojas presentan antocianinas derivadas de la pelargonidina. En general, las flores de las salvias estudiadas presentan antocianinas aciladas, lo cual corresponde a lo reportado para las flores de la familia Lamiaceae.⁷⁴

CONCLUSIONES

Se cuantificaron las antocianinas totales y se estableció el perfil de antocianinas de diferentes frutos, flores y vegetales de importancia económica en México. Los maíces coloridos y flores de salvias mostraron tener una alta concentración de antocianinas aciladas.

Además se identificaron y se caracterizaron las principales antocianinas presentes en el maíz morado de Ixtenco y maíz cacahuacintle. El análisis del maíz morado de Ixtenco muestra que la mayor concentración de antocianinas aciladas se presenta a los 113 días después de la siembra (tiempo 2) y de las partes analizadas el olote es el que contiene la mayor concentración de antocianinas con 16 mg/g.

En el caso del maíz cacahuacintle se observó que a los 160 días después de la siembra (tiempo 3) presenta mayor concentración de antocianinas totales y aciladas, el totomoxtle de este maíz es el que presenta mayor concentración con 23 mg/g.

Por último de las nueve salvias analizadas las flores de *Salvia fulgens* presentaron la mayor concentración de antocianinas con 20 mg/g seguida de la *S. lineata* (16 mg/g) y *S. mexicana* (9 mg/g) y todas las salvias presentaron antocianinas aciladas con ácido cafeico y/o *p*-cumárico.

ANEXOS

FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS

1. Antocianinas Totales

El método usado para la determinación de antocianinas totales fue el de pH-diferencial, este es un método espectrofotométrico que muestra el contenido de antocianinas totales y se basa en el cambio de color que tienen las antocianinas a diferente pH como se muestra en la Figura 39, a pH 1 el ion flavilio tiene una coloración roja, y a pH 4.5 predomina el hemiacetal que es incoloro y la absorbancia se mide a dos longitudes de onda 510 nm (máximo de absorción) y a 700 nm para evitar interferencias, si la muestra está muy turbia es necesario clarificarla por centrifugación o filtración. La absorbancia debe estar entre 0.2 y 1.4 AU. En este método se asume que las antocianinas tienen poca o nula absorbancia a pH 4.5 y que las antocianinas polimerizadas o degradadas absorben a ese pH.⁷⁵

La concentración de antocianinas se expresa como el equivalente de cianidina-3-glucósido de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas (equivalentes de cianidina - 3 - gluc), mg/L} = \frac{A \times PM \times FD \times 10^3}{\epsilon \times 1}$$

En donde:

$$A = (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1.0} - (A_{510 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4.5}$$

PM (peso molecular)= 449.2 g/mol_{cianidina-3-glu}

FD (Factor de dilución)=10

ϵ (Coeficiente de absortividad molar de cianidina-3-glu) =26 900 Lcm⁻¹ mol⁻¹

10³=Factor de conversión de gramos a miligramos

La concentración final de antocianinas en mg/g se calcula en base al volumen de extracto y peso de la muestra, tomando en cuenta la dilución que se hizo a partir del extracto.

El método pH-diferencial ha sido validado y ha sido aprobado por la AOAC como método oficial (AOAC método 2005.2).

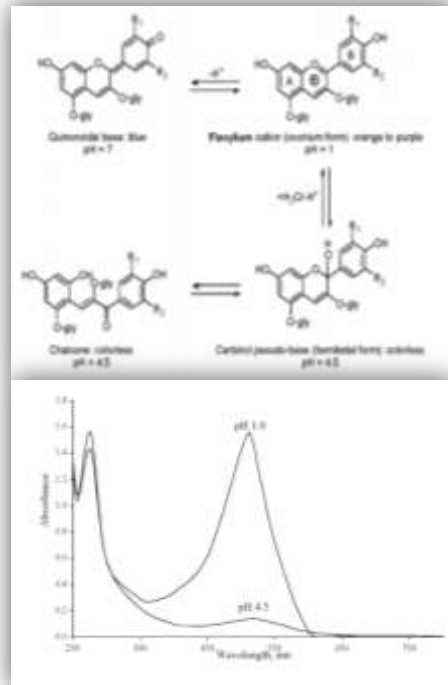


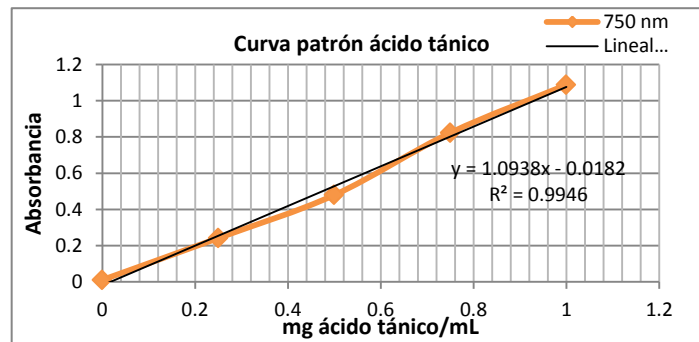
Figura 39. Efecto del pH en las antocianinas

2. Fenoles Totales

Para la determinación de fenoles totales se usó la técnica de Folin-Ciocalteu, se fundamenta en el poder reductor del reactivo de Folin que es una mezcla de ácido fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia del color azul se mide a 760 nm.

Se tomaron 200 μ L del extracto y se agregaron a 2 mL de carbonato de sodio y se dejaron reaccionar por 2 min. Se le añadió el reactivo de Folin Ciocalteu diluido con agua (1:1) y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 30 min. Se midió la absorbancia a 760nm.

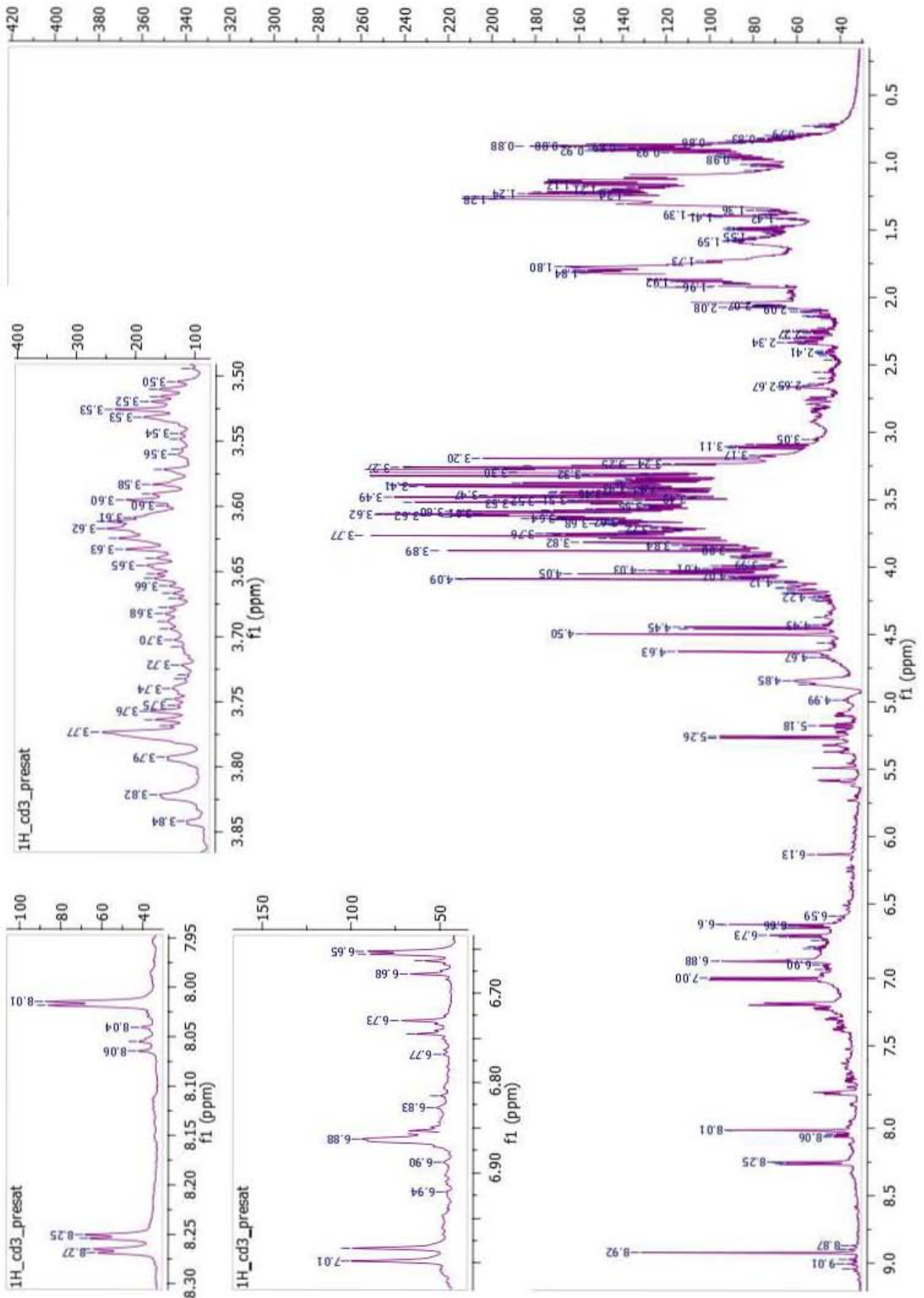
Para conocer la concentración de polifenoles totales se elaboró una curva patrón con ácido tánico en un rango de concentración de 0-1mg_{ac. tánico}/mL.



Gráfica 7. Curva patrón para fenoles totales

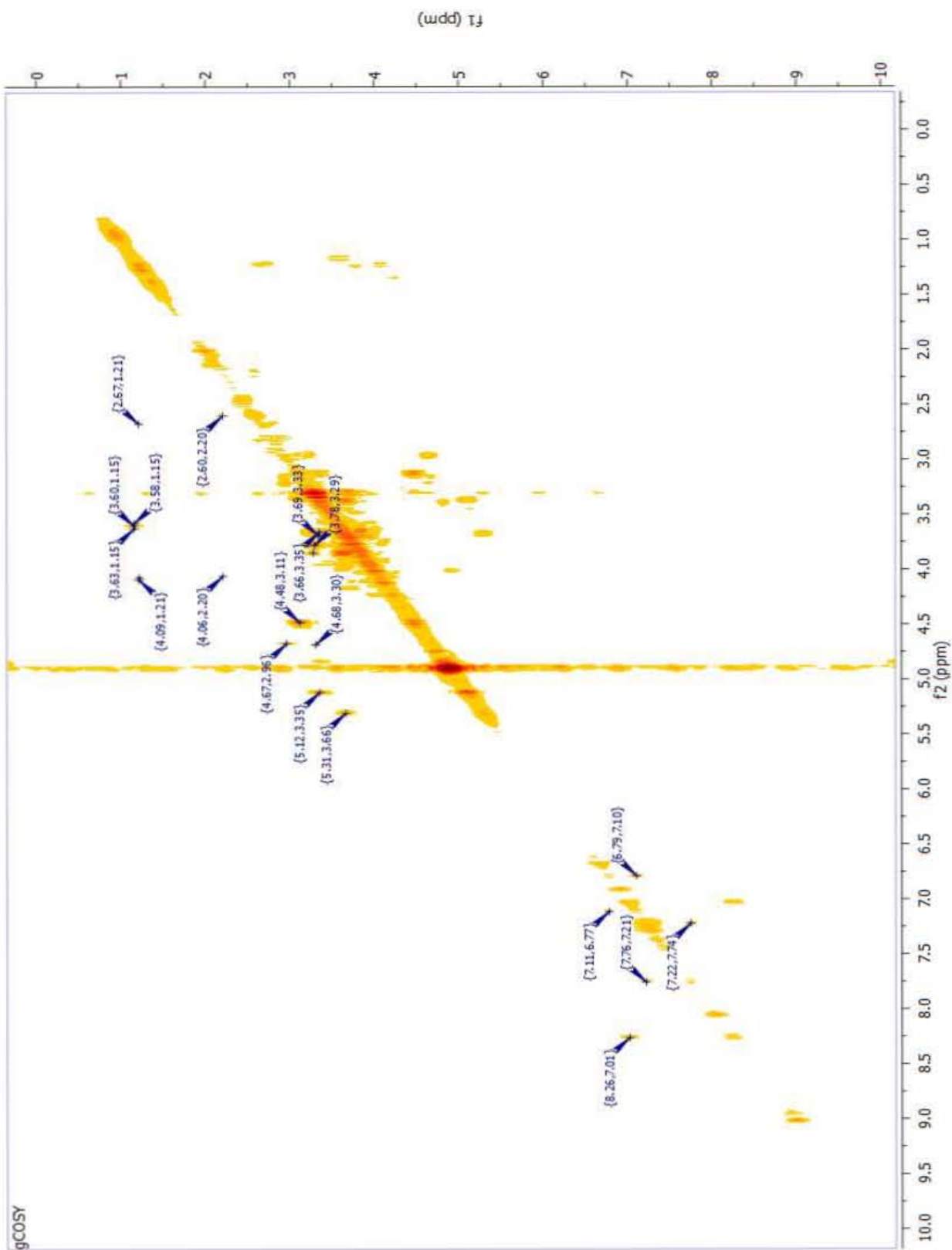
Espectroscopia RMN.

¹H de la Cianidina-3-glucósido

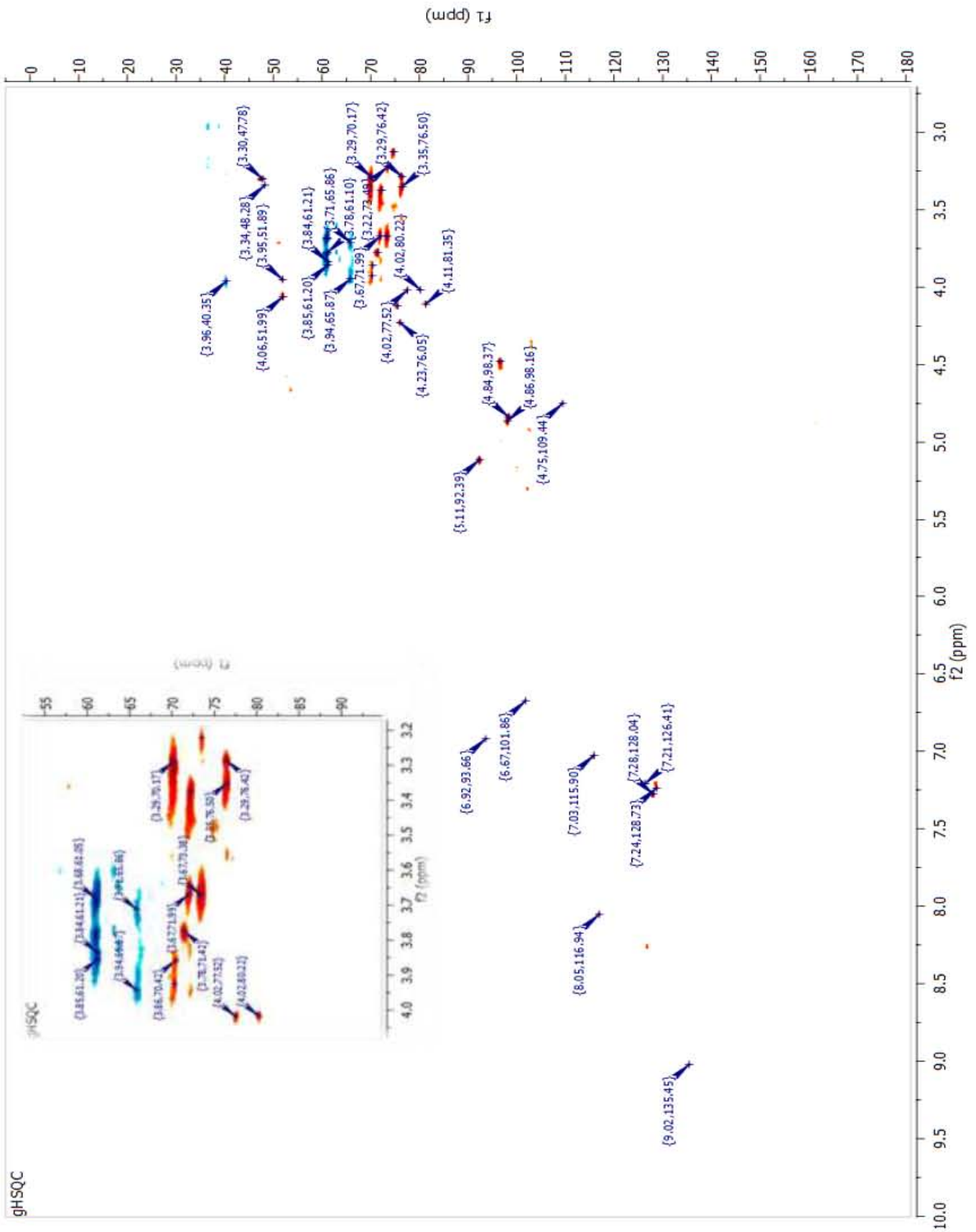


ANEXOS

COSY de la cianidina-3-glucósido

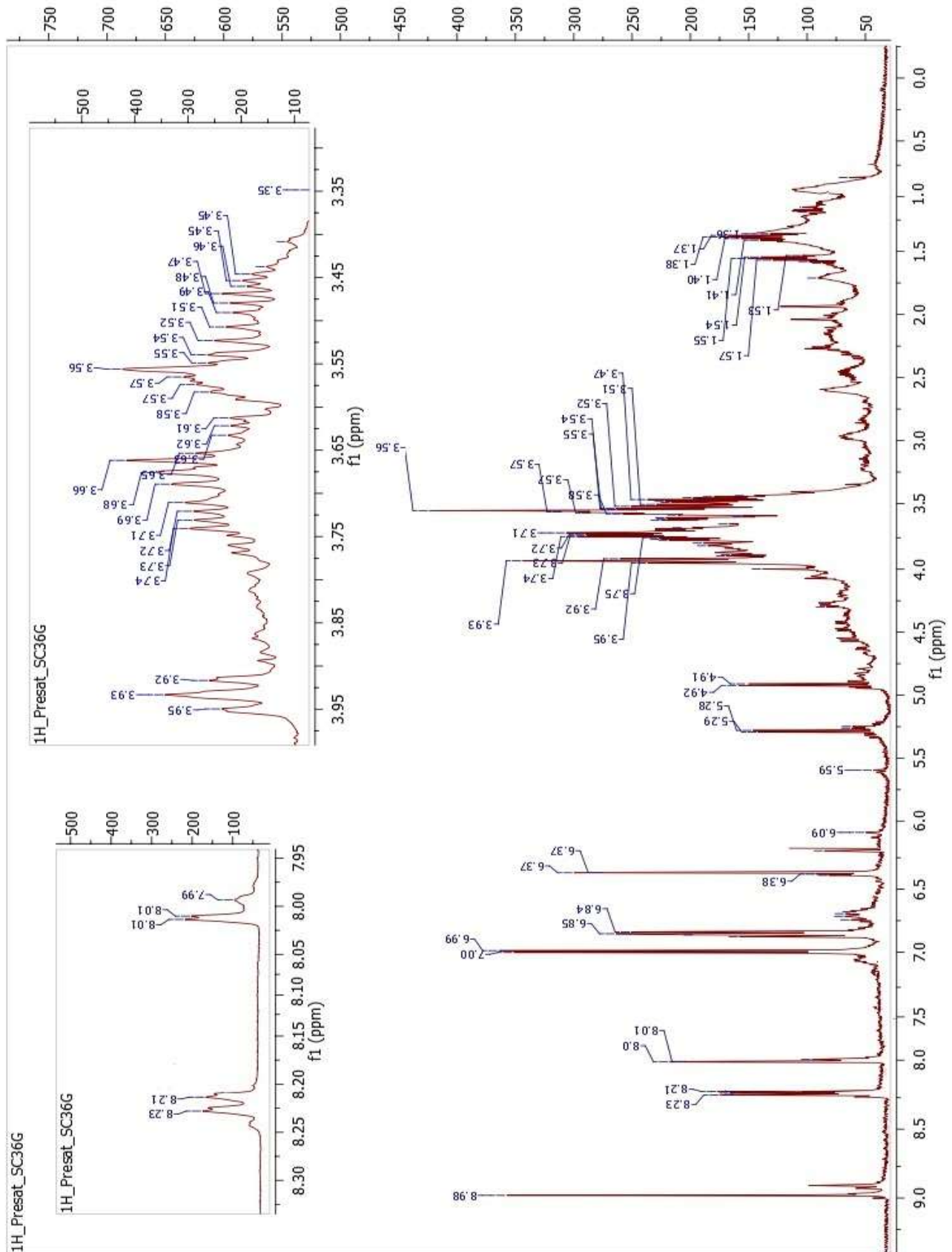


HSQC de la cianidina-3-glucósido



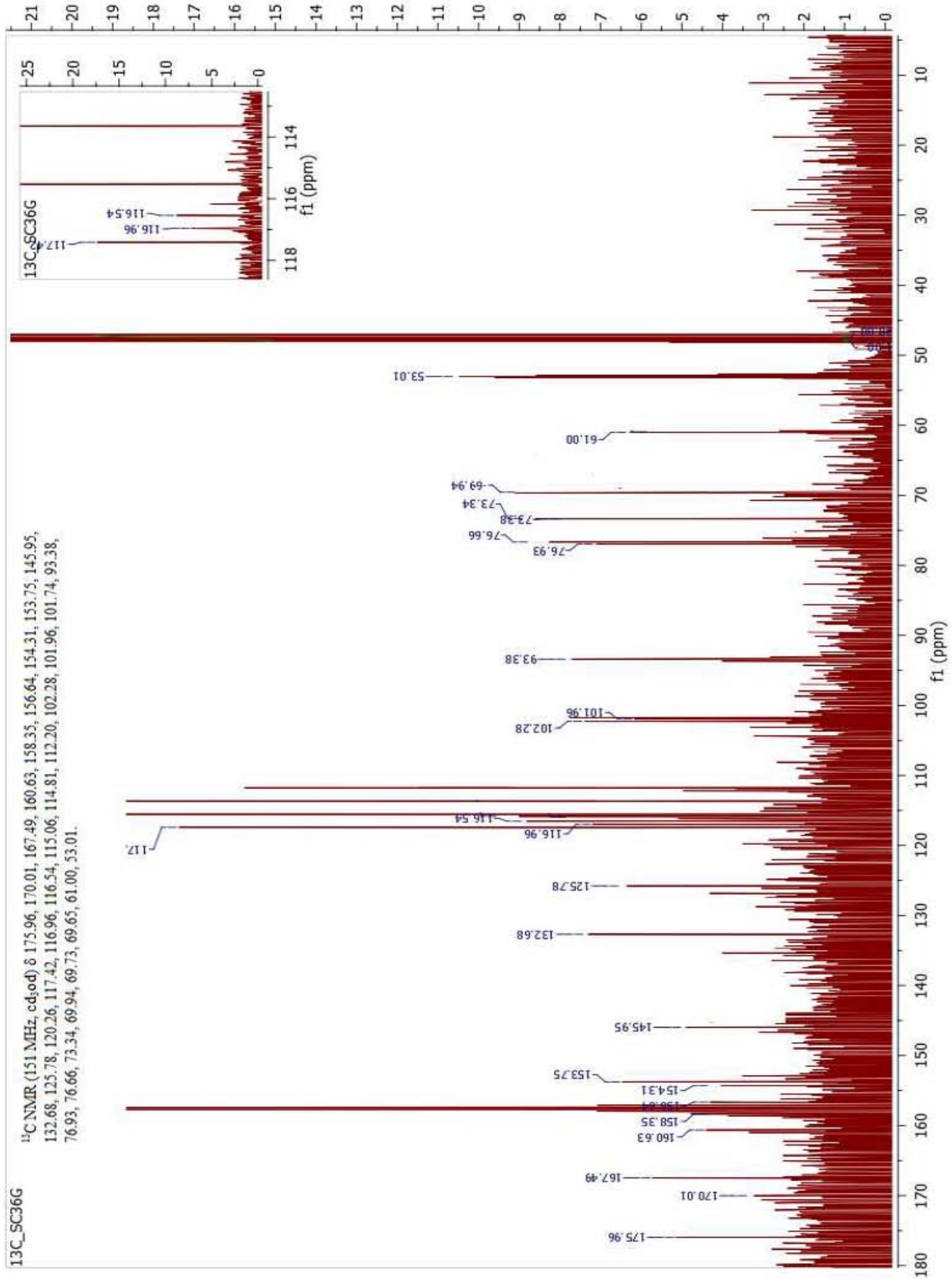
ANEXOS

^1H de la Cianidina-3-6''malonilglucósido

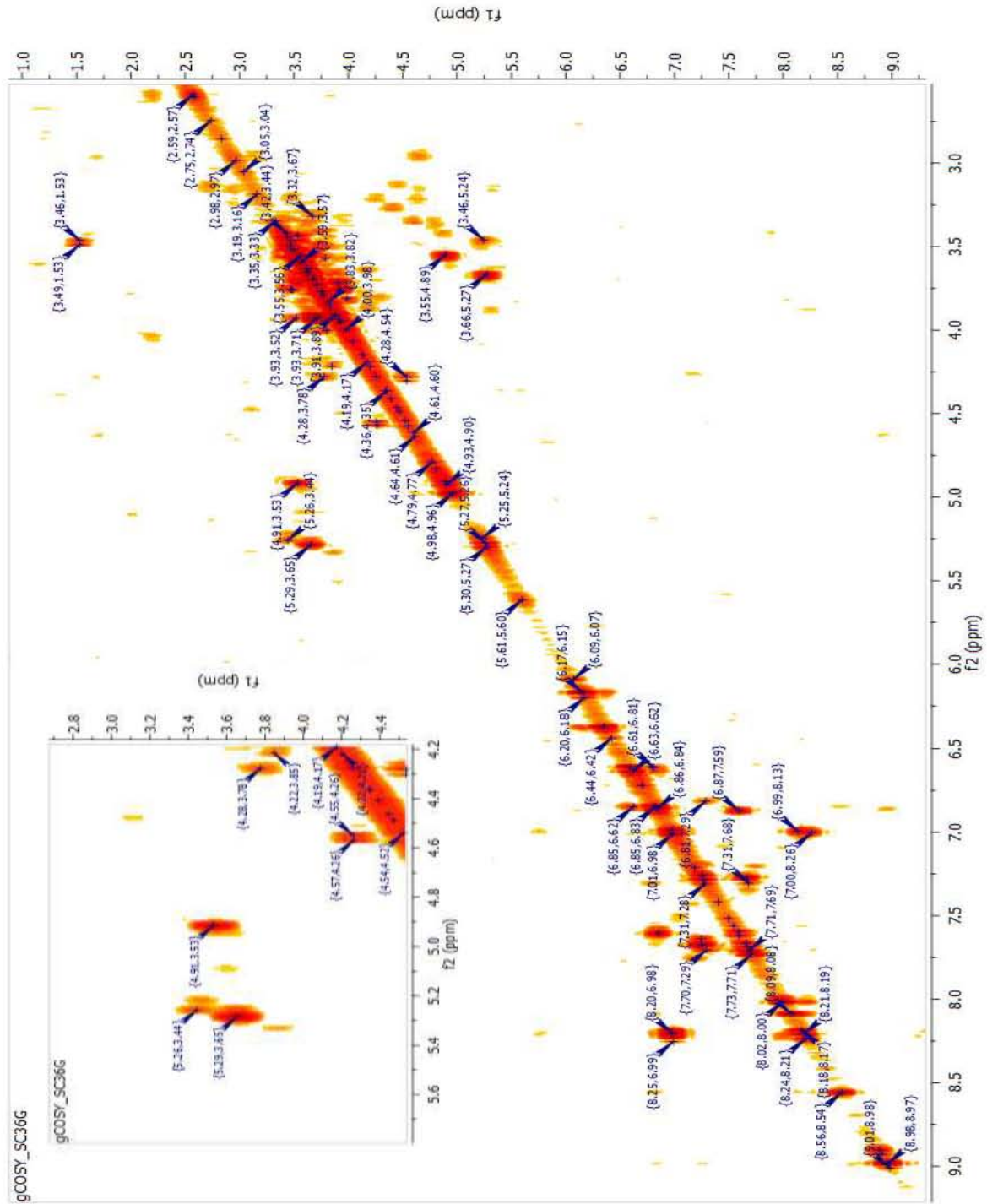


ANEXOS

^{13}C de la Cianidina-3-6'' malonilglucósido

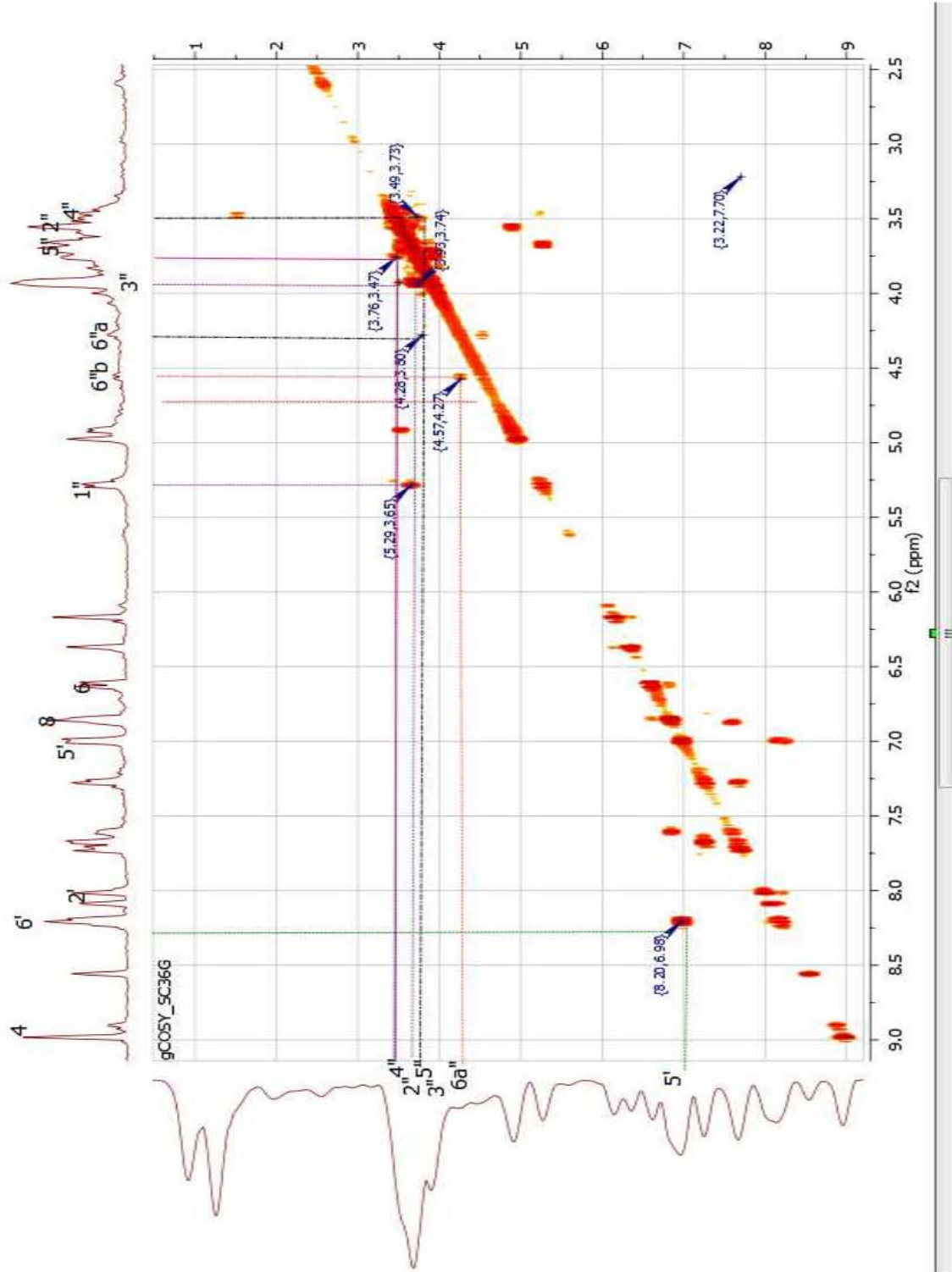


COSY de la Cianidina-3-6'' malonilglucósido



ANEXOS

HSQC de la Cianidina-3-6'' malonilglucósido



REFERENCIAS

- (1) Schwartz, S.; Von-Elbe, J. H.; Giusti, M. Colorantes. *Química de Alimentos*; Damodaran, S.; Parkin, K. L.; Fennema, O. R., Eds.; ACRIBIA: Zaragoza España, **2010**; pp. 572–630.
- (2) Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E. Acylated Anthocyanins from Edible Sources and Their Applications in Food Systems. *Biochem. Eng. J.* **2003**, *14*, 217–225.
- (3) El-Sayed, M.; Abdel-aal; Young, C.; Rabalski, I. Anthocyanin Composition in Black , Blue , Pink , Purple , and Red Cereal Grains. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54f*, 4696–4704.
- (4) Tomás-Barberán, F. A.; Harborne, J. B. Dimalonated Anthocyanins from the Flowers of *Salvia Splendens* and *S. Coccinea*. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2759–2760.
- (5) Escribano-Bailón, M. T.; Santos-buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C. Anthocyanins in Cereals. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054*, 129–141.
- (6) Salinas Moreno, Y.; Aragón Cuevas, F.; Ybarra Moncada, C.; Aguilar Villarreal, J.; Altunar, B.; Sosa, E. Caracterización Física Y Composición Química de Razas de Maíz de Grano Azul/morado de las Regiones Tropicales y Subtropicales de Oaxaca. *Rev. Fitotec. Mex.* **2013**, *36*, 23–31.
- (7) Jing, P.; Noriega, V.; Schwartz, S. J.; Giusti, M. M. Effects of Growing Conditions on Purple Corn cob (*Zea Mays* L.) Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8625–8629.
- (8) Cornejo-Tenorio, G.; Ibarra-manríquez, G. Diversidad y Distribución del Género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán, México. *Rev. Mex. Biodivers.* **2011**, *82*, 1279–1296.
- (9) Ishikawa, T.; Kondo, T.; Kinoshita, T.; Haruyama, H.; Inaba, S.; Takeda, K. An Acetylated Anthocyanin from the Blue Petals of *Salvia uliginosa*. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 517–521.
- (10) Salinas Moreno, Y.; Rubio, D.; Díaz, A. Extraction and Use of Pigments from Maize Grains (*Zea Mays* L.) as Colorants in Yogur. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2005**, *55*, 293–298.
- (11) Rymbai, H.; Sharma, R. R.; Srivastav, M. Biocolorants and Its Implications in Health and Food Industry - A Review. *Int. J. Pharm Tech Res.* **2011**, *3*, 2228–2244.
- (12) Bkowska-Barczak, A. Acylated Anthocyanins as Stable, Natural Food Colorants- A Review. *Polish J. food Nutr. Sci.* **2005**, *14*, 107–115.
- (13) http://www.unizar.es/med_naturista/bioactivos_en_alimentos.pdf. (Consultado en marzo del **2014**)
- (14) Andrés-Lacueva, C.; Medina-Remon, A.; Llorach, R.; Urpi-Sarda, M.; Khan, N.; Chiva-Blanch, G.; Zamora-Ros, R.; Rotches-Ribalta, M.; Lamuela-Reventós, R. Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals*; De la Rosa, L.; Alvarez-Parilla, E.; González-Aguilar, G., Eds.; Wiley-Blackwell: New Delhi, India, **2010**; p. 382.
- (15) Cuevas Montilla, E.; Antezana, A.; Winterhalter, P. Análisis Y Caracterización de Antocianinas En Diferentes Variedades de Maíz (*Zea Mays*) Boliviano. *Memorias Red Alfa Lagrotech* **2008**, *Cartagena*, 21–26.
- (16) Yan, Q.; Zhang, L.; Zhang, X.; Liu, X.; Yuan, F.; Hou, Z.; Gao, Y. Stabilization of Grape Skin Anthocyanins by Copigmentation with Enzymatically Modified Isoquercitrin (EMIQ) as a Copigment. *FRIN* **2011**.

REFERENCIAS

- (17) Stintzing, F. C.; Trichterborn, J.; Carle, R. Food Chemistry Characterisation of Anthocyanin- Betalain Mixtures for Food Colouring by Chromatic and HPLC-DAD-MS Analyses. *Food Chem.* **2006**, *94*, 296–309.
- (18) *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*; Øyvind M. Andersen; Kenneth R., M., Eds.; Taylor & F.; Norway, **2006**; p. 1199.
- (19) Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M. D. L.; Páez-Hernández, M. E.; Rodríguez, J. a.; Galán-Vidal, C. A. Chemical Studies of Anthocyanins: A Review. *Food Chem.* **2009**, *113*, 859–871.
- (20) Cooper-driver, G. A. Contributions of Jeffrey Harborne and Co-Workers to the Study of Anthocyanins. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 229–236.
- (21) Cevallos-Casals, B. a; Cisneros-Zevallos, L. Stability of Anthocyanin-Based Aqueous Extracts of Andean Purple Corn and Red-Fleshed Sweet Potato Compared to Synthetic and Natural Colorants. *Food Chem.* **2004**, *86*, 69–77.
- (22) Figueiredo, P.; Elhabiri, M.; Toki, K.; Saito, N.; Dangles, O.; Brouillard, R. New Aspects of Anthocyanin Complexation. Intramolecular Copigmentation as a Means for Colour Loss? *Phytochemistry* **1996**, *41*, 301–308.
- (23) Gould, K.; Davies, K.; Winefield, C. *Anthocyanins. Biosynthesis, Functions and Applications*; Springer New York: New Zealand, **2009**; p. 345.
- (24) Lee, D. W.; Gould, K. S. Anthocyanins in Leaves and Other Vegetative Organs: An Introduction. *Adv. Bot. Res.* **2002**, *37*, 1–16.
- (25) Zhang, K.-M.; Yu, H.-J.; Shi, K.; Zhou, Y.-H.; Yu, J.-Q.; Xia, X.-J. Photoprotective Roles of Anthocyanins in Begonia Semperflorens. *Plant Sci.* **2010**, *179*, 202–208.
- (26) Hyoung S. Lee. Chromatographic Analysis of Anthocyanins. *J. Chromatogr. A* **1992**, *625*, 221–234.
- (27) Lee, J.; Rennaker, C.; Wrolstad, R. E. Correlation of Two Anthocyanin Quantification Methods: HPLC and Spectrophotometric Methods. *Food Chem.* **2008**, *110*, 782–786.
- (28) Moreno, Y. S.; Salinas, C. G.; Coutiño, B.; Vidal, V. A. Variabilidad en Contenido y Tipos de Antocianinas en Granos de Color Azul/Morado de Poblaciones Mexicanas de Maíz. *Rev. Fitotec. Mex.* **2013**, *36*, 285–294.
- (29) Ciencias, M. E. N. Rendimiento de Grano y Contenido de Antocianinas En Poblaciones de Maíz de la Región de Huaquechula, Puebla, Colegio de Postgraduados. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, **2011**, pp. 1–61.
- (30) Mendoza Mendoza, C. G. Las Antocianinas Del Maíz: Su Distribución En La Planta Y Producción, Colegio de postgraduados, **2012**, p. 130.
- (31) Yang, Z.; Zhai, W. Identification and Antioxidant Activity of Anthocyanins Extracted from the Seed and Cob of Purple Corn (*Zea Mays* L.). *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2010**, *11*, 169–176.
- (32) Harborne, J. B.; Self, R. Malonated Cyanidin-3-glucosides in *Zea Mays* and and Other Grasses. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2417–2418.
- (33) Quispe Jacobo, F.; Arroyo Condorena, K.; Gorriti Gutiérrez, A. Características Morfológicas y Químicas de 3 Cultivares de Maíz Morado (*Zea Mays* L.) En Arequipa-Perú. *Rev. Soc. Quim Perú* **2011**, *77*, 205–217.
- (34) El-Sayed, M.; Abdel-aal; Young, C.; Rabalski, I. Anthocyanin Composition in Black , Blue , Pink , Purple , and Red Cereal Grains. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4696–4704.

REFERENCIAS

- (35) Jing, P.; Giusti, M. M. Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea Mays* L.) Color Extract. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, C363–8.
- (36) Chung-Ying, L.; Hee-Woong, K.; Se-Ra, W.; Hwang-Kee, M.; Ki-Jin, P.; Jong-Yeol, P.; Mun-Seob, A.; Hae-Ik, R. Corn Husk as a Potential Source of Anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11413–11416.
- (37) <http://www.tropicos.org/docs/meso/lamiaceae.pdf>. (Consultado en marzo del **2014**)
- (38) Lu, Y.; Foo, L. Y. Polyphenolics of Salvia - a Review. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 117–140.
- (39) Jenks, A. a; Kim, S.-C. Medicinal Plant Complexes of Salvia Subgenus Calospatha: An Ethnobotanical Study of New World Sages. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *146*, 214–224.
- (40) Haque, M. s; Ghoshal, D. N.; Ghoshal, K. K. Anthocyanins in Salvia. Their Significance in Species Relationship and Evolution. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.* **1989**, *2*, 204–209.
- (41) Mori, M.; Kondo, T.; Yoshida, K. Cyanosalvianin, a Supramolecular Blue Metalloanthocyanin, from Petals of *Salvia Uliginosa*. *Phytochemistry* **2008**, *69*, 3151–3158.
- (42) Takeda, K.; Yanagisawa, M.; Kifune, T.; Kinoshita, T.; Timberlake, C. F. A Blue Pigment Complex in Flowers of *Salvia Patens*. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 1167–1169.
- (43) Cox, K. a; McGhie, T. K.; White, A.; Woolf, A. B. Skin Colour and Pigment Changes during Ripening of “Hass” Avocado Fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **2004**, *31*, 287–294.
- (44) Jiménez, A. M.; Sierra, C. A.; Rodríguez-Pulido, F. J.; González-Miret, M. L.; Heredia, F. J.; Osorio, C. Physicochemical Characterisation of Gulupa (*Passiflora Edulis* Sims. Fo Edulis) Fruit from Colombia during the Ripening. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 1912–1918.
- (45) Pallauf, K.; Rivas-Gonzalo, J. C.; del Castillo, M. D.; Cano, M. P.; de Pascual-Teresa, S. Characterization of the Antioxidant Composition of Strawberry Tree (*Arbutus Unedo* L.) Fruits. *J. Food Compos. Anal.* **2008**, *21*, 273–281.
- (46) Nordey, T.; Joas, J.; Davrieux, F.; Génard, M.; Léchaudel, M. Non-Destructive Prediction of Color and Pigment Contents in Mango Peel. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. **2014**, *171*, 37–44.
- (47) Harborne, J. B.; Smith, D. M. Correlations between Anthocyanin Chemistry and Pollination Ecology in the Polemoniaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* **1978**, *6*, 3–6.
- (48) Todaro, a; Cimino, F.; Rapisarda, P.; Catalano, a; Barbagallo, R.; Spagna, G. Recovery of Anthocyanins from Eggplant Peel. *Food Chem.* **2009**, *114*, 434–439.
- (49) Da Silva, F. L.; Escribano-Bailón, M. T.; Pérez Alonso, J. J.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C. Anthocyanin Pigments in Strawberry. *LWT - Food Sci. Technol.* **2007**, *40*, 374–382.
- (50) Brown, P. N.; Shipley, P. R. Determination of Anthocyanins in Cranberry Fruit and Cranberry Fruit Products by HPLC with Ultraviolet Detection : Single-Laboratory Validation. *J. AOAC Int.* **2012**, *94*, 459–466.
- (51) Usenik, V.; Stampar, F.; Veberic, R. Anthocyanins and Fruit Colour in Plums (*Prunus Domestica* L.) during Ripening. *Food Chem.* **2009**, *114*, 529–534.
- (52) Dueñas, M.; Pérez-Alonso, J. J.; Santos-Buelga, C.; Escribano-Bailón, T. Anthocyanin Composition in Fig (*Ficus Carica* L.). *J. Food Compos. Anal.* **2008**, *21*, 107–115.

REFERENCIAS

- (53) Turfan, Ö.; Türkyılmaz, M.; Yemiş, O.; Özkan, M. Anthocyanin and Colour Changes during Processing of Pomegranate (*Punica Granatum* L., Cv. Hicaznar) Juice from Sacs and Whole Fruit. *Food Chem.* **2011**, *129*, 1644–1651.
- (54) Longo, L.; Scardino, A.; Vasapollo, G.; Blando, F. Anthocyanins from *Eugenia Myrtifolia* Sims. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2007**, *8*, 329–332.
- (55) Scogin, R. Anthocyanins of the Bignoniaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* **1980**, *8*, 273–276.
- (56) Alcalde-Eon, C.; Saavedra, G.; Pascual-Teresa, S. De; Rivas-Gonzalo, J. C. Liquid Chromatography–mass Spectrometry Identification of Anthocyanins of Isla Oca (*Oxalis Tuberosa*, Mol.) Tubers. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054*, 211–215.
- (57) Takeda, K.; Harborne, J. B.; Self, R. Identification and Distribution of Malonated Anthocyanins in Plants of the Compositae. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1337–1342.
- (58) Akashi, T.; Saito, N.; Hirota, H.; Ayabe, S. Anthocyanin-Producing Dandelion Callus as a Chalcone Synthase Source in Recombinant Polyketide Reductase Assay. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 283–287.
- (59) Mulabagal, V.; Ngouajio, M.; Nair, A.; Zhang, Y.; Gottumukkala, A. L.; Nair, M. G. In Vitro Evaluation of Red and Green Lettuce (*Lactuca Sativa*) for Functional Food Properties. *Food Chem.* **2010**, *118*, 300–306.
- (60) Fossen, T.; Andersen, Ø. M. Anthocyanins from Red Onion, *Allium Cepa*, with Novel Aglycone. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 1217–1220.
- (61) Algarra, M.; Fernandes, A.; Mateus, N.; de Freitas, V.; Esteves da Silva, J. C. G.; Casado, J. Anthocyanin Profile and Antioxidant Capacity of Black Carrots (*Daucus Carota* L. Ssp. *Sativus* Var. *Atrorubens* Alef.) from Cuevas Bajas, Spain. *J. Food Compos. Anal.* **2014**, *33*, 71–76.
- (62) Wickowski, W.; Szawara-Nowak, D.; Topolska, J.; Red Cabbage Anthocyanins Profile, Isolation, Identification and Antioxidant Activity. *Food Res. Int.* **2013**, *51*, 303–309.
- (63) Otsuki, T.; Matsufuji, H.; Takeda, M.; Toyoda, M.; Goda, Y. Acylated Anthocyanins from Red Radish (*Raphanus Sativus* L.). *Phytochemistry* **2002**, *60*, 79–87.
- (64) Li, J.; Li, X.; Zhang, Y.; Zheng, Z.; Qu, Z.; Liu, M.; Zhu, S.; Liu, S.; Wang, M.; Qu, L. Identification and Thermal Stability of Purple-Fleshed Sweet Potato Anthocyanins in Aqueous Solutions with Various pH Values and Fruit Juices. *Food Chem.* **2013**, *136*, 1429–1434.
- (65) Zhang, L.; Fu, Q.; Zhang, Y. Composition of Anthocyanins in Pomegranate Flowers and Their Antioxidant Activity. *Food Chem.* **2011**, *127*, 1444–1449.
- (66) Fernández Aulis, M. F. Aplicación de Tecnologías Emergentes para la Extracción Óptima de Antocianinas del Totomoxtle y Olote de Maíz Criollo Morado, Universidad Nacional Autónoma de México, **2012**.
- (67) Wu, X.; Prior, R. L. Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2589–2599.
- (68) Fossen, T.; Øvstedal, D. O. Anthocyanins from Flowers of the Orchids *Dracula Chimaera* and *D. Cordobae*. *Phytochemistry* **2003**, *63*, 783–787.
- (69) Migas, P.; Grzelak, D.; Krauze-Baranowska, B. Special Issue on Role of HPTLC in Analysis. *Int. J. Pharm. Chem. Res.* **2013**, *2*, 22–28.

REFERENCIAS

- (70) Cretu, G. C.; Morlock, G. E. Analysis of Anthocyanins in Powdered Berry Extracts by Planar Chromatography Linked with Bioassay and Mass Spectrometry. *Food Chem.* **2014**, *146*, 104–112.
- (71) Otake, K.; Terahara, N.; Saito, N.; Toki, K.; Honda, T. Chemical Structures of Two Anthocyanins from Purple Sweet Potato. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2127–2130.
- (72) Krüger, S.; Urmann, O.; Morlock, G. E. Development of a Planar Chromatographic Method for Quantitation of Anthocyanes in Pomace, Feed, Juice and Wine. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1289*, 105–118.
- (73) Harborne, J. B. Spectral Methods of Characterizing Anthocyanins. *Biochem. J.* **1958**, *70*, 22–28.
- (74) Saito, N.; Harborne, J. B. Correlations between Anthocyanin Type, Pollinator and Flower Colour in the Labiatae. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3009–3015.
- (75) Lee, J.; Durst, R. W.; Wrolstad, R. E. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 1269–1278.
- (76) Pascual, V.; Valls, R. M.; Solà, R. Cacao y Chocolate: ¿un Placer Cardiosaludable? *Clínica e Investig. en Arterioscler.* **2009**, *21*, 198–209.
- (77) www.conabio.gob.mx. (Consultado en Marzo del **2014**)
- (78) <http://jocabro.blogspot.mx>. (Consultado en Agosto del **2014**)
- (79) Uzárraga, A. Las Partes del Maíz. *Arqueología Mexicana*. 2011, p. 54.
- (80) <http://www.dlt.ncssm.edu/tiger/bio1.htm>. (Consultado en Agosto del **2014**)
- (81) <http://www.scientificartist.com/photography/photomicroscopy/nggallery/page/1>. (Consultado en Agosto del **2014**)