

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO  
AMBIENTE**



**TESIS**

**EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS  
DEL MIO – MIO (*Coriaria ruscifolia* L) POR ESPECTROSCOPIA FTIR y HPLC**

**PRESENTADA POR:**

**MELQUIADES BARRAGAN CONDORI**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:**

**DOCTORIS SCIENTIAE EN CIENCIA, TECNOLOGIA Y MEDIO AMBIENTE**

**PUNO, PERÚ**

**2017**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO  
AMBIENTE



TESIS

EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS  
DEL MIO – MIO (*Coriaria ruscifolia* L) POR ESPECTROSCOPIA FTIR y  
HPLC.

PRESENTADA POR:

MELQUIADES BARRAGAN CONDORI

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE: DOCTORIS SCIENTIAE (D.Sc.) EN  
CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

APROBADA POR EL JURADO SIGUIENTE:

PRESIDENTE

  
.....  
Dr. EDGARDO PINEDA QUISPE

PRIMER MIEMBRO

  
.....  
Ph.D. SABINO ATENCIO LIMACHI

SEGUNDO MIEMBRO

  
.....  
Dr. FELIPE SANTIAGO AMACHI FERNÁNDEZ

ASESOR DE TESIS

  
.....  
Ph.D. JUAN MARCOS ARO ARO

Puno, 18 de diciembre del 2017

**ÁREA:** Ciencia, tecnología y medio ambiente.

**TEMA:** Compuestos bioactivos.

**LÍNEA:** Impacto tecnológico ambiental.

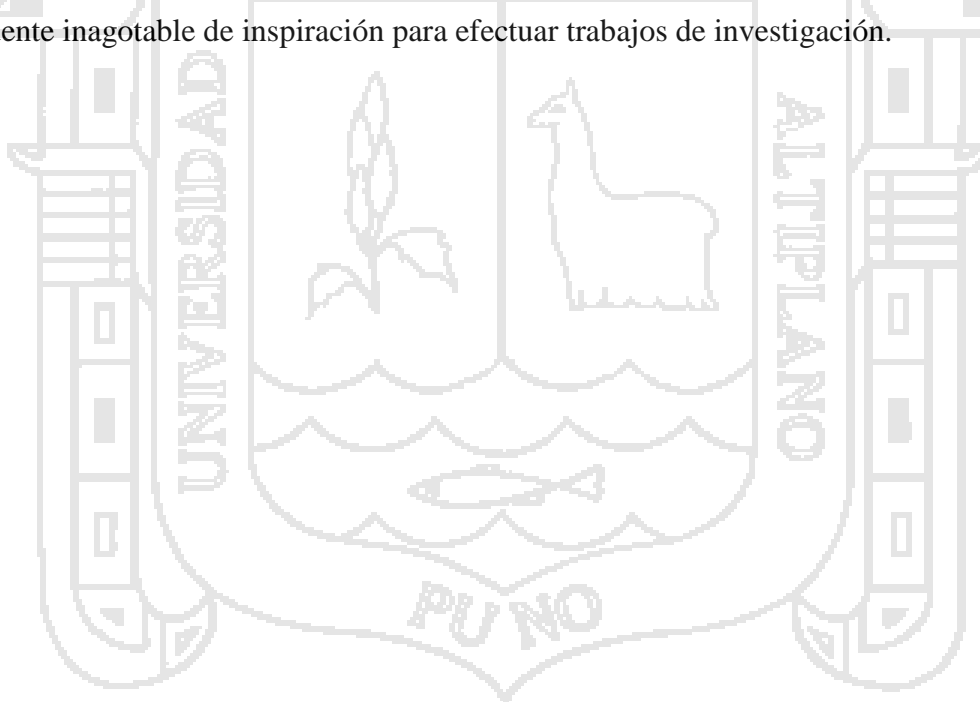
## DEDICATORIA

A mis queridos padres María y Sabino, a mis hermanos Washington e Smith, a mi esposa Reyna a mis hijos Luis David, Carlos Yamil, Ingrith Antonieta y toda mi familia quienes son los que me ayudaron a lograr este objetivo y son la razón de este esfuerzo. También dedico este trabajo a todos mis maestros, asesores, colegas, compañeros que me forjaron y coadyuvaron en esta senda de la Química.



## AGRADECIMIENTOS

A mis profesores del posgrado de la UNA PUNO, mi asesor del trabajo de investigación Dr. Juan Marcos Aro Aro, a mis Jurados, Dr. Edgardo Pineda Quispe, Ph.D. Sabino Atencio Limachi y Dr. Felipe Amachi Fernández, a mi colega Quím. Jorge Choquenaira Pari, al Dr. Leoncio Solís Quispe por forjar la parte experimental y fotoquímica de este trabajo de investigación, al Ing. Justo Arias Mota por brindarme su incondicional apoyo en los laboratorios de la UNAMBA y a todos mis colegas de la UNAMBA y UNSAAC entre ellos a la Dra. Celina Luízar Obregón, el Mgt. Carlos Serrano Flores, Quím. Yanet Gonzales Bellido, etc. por haberme facilitado y asesorado con las técnicas de análisis, en forma muy especial a la Dra. M. Mónica Giusti Hundskopf por la alta capacitación en cursos de cromatografía HPLC, FTIR, UV-Vis en la UNSAAC, etc. aplicado en antocianinas y a los estudiantes de las diferentes Universidades en las que encontré la fuente inagotable de inspiración para efectuar trabajos de investigación.



**ÍNDICE GENERAL**

DEDICATORIA ..... i

AGRADECIMIENTOS ..... ii

ÍNDICE DE TABLAS ..... viii

ÍNDICE DE FIGURAS ..... x

ÍNDICE DE ANEXOS ..... xiii

RESUMEN ..... xiv

INTRODUCCIÓN ..... 1

**CAPÍTULO I**

**REVISIÓN DE LITERATURA**

1.1. Marco Teórico..... 3

    1.1.1. Características Botánicas del mio mio ..... 3

    1.1.2. Taxonomía del mio – mio (*Coriaria ruscifolia* L) ..... 5

    1.1.3. Distribución ..... 6

    1.1.4. Nombres comunes ..... 6

    1.1.5. Usos ..... 6

    1.1.6. Pigmentos en plantas tintóreas. .... 6

    1.1.7. Compuestos fenólicos..... 6

    1.1.8. Antocianinas ..... 8

    1.1.9. Carotenoides ..... 8

1.2. Alimentos funcionales..... 9

    1.2.1. Alimento nutracéutico ..... 9

1.2.2.	Radicales libres.....	10
1.2.3.	Compuestos antioxidantes .....	11
1.2.4.	Estrés oxidativo. ....	11
1.2.5.	Capacidad antioxidante .....	12
1.2.6.	Compuestos fenólicos.....	13
1.2.7.	Polifenoles.....	16
1.2.8.	Flavonoides.....	18
1.2.8.1.	Antocianinas.....	19
1.2.8.2.	Estabilidad de antocianinas .....	22
1.2.8.3.	Extracción de antocianinas.....	24
1.2.8.4.	Espectroscopia FTIR de antocianinas. ....	32
1.2.8.5.	Separación e identificación de antocianinas por HPLC .....	37
1.2.9.	Análisis de antioxidantes en compuestos fenólicos.....	42
1.2.9.1.	Determinación del contenido de antocianinas totales por el método pH diferencial.....	42
1.2.9.2.	Determinación de polifenoles totales por el método Folin – Ciocalteu.....	43
1.2.9.3.	Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS.....	45
1.3.	Antecedentes .....	47

**CAPÍTULO II**

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

2.1.	Identificación del problema.....	50
2.2.	Enunciados del problema objeto de investigación .....	50
2.3.	Justificación de la investigación.....	51
2.4.	Objetivos de la investigación.....	52
2.4.1.	Objetivo General.....	52
2.4.2.	Objetivos específicos .....	53
2.5.	Hipótesis general y variable.....	53
2.5.1.	Hipótesis general.....	53
2.5.2.	Hipótesis específica .....	53
2.6.	Identificación de variables .....	53

**CAPÍTULO III**

**MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1.	Lugar de ejecución del trabajo de investigación .....	54
3.2.	Población de estudio. ....	54
3.3.	Muestra.....	55
3.2.1	Materiales y equipos .....	55
3.2.2	Reactivos.....	56
3.4.	Tipo y diseño de investigación.....	56
3.5.	Análisis de las muestras .....	57
3.5.1.	Estados de conservación de materia prima .....	57

3.5	Parte experimental.....	58
3.5.2.	Extracción de antocianinas .....	58
3.5.3.	Purificación de las antocianinas extraídas usando C-18.....	58
3.6	Caracterización de antocianinas.....	59
3.6.1.	Espectro UV Visible de antocianinas .....	59
3.6.2.	Espectro FTIR – ATR de antocianinas.....	60
3.6.3.	Identificación de antocianinas por HPLC.....	60
3.6.4.	Caracterización de antocianidinas por HPLC.....	61
3.7	Determinación de contenido de antocianinas totales (CAT) mediante el método pH diferencial .....	73
3.8	Determinación de polifenoles totales (PFT) .....	76
3.8.1	Preparación de la curva de calibración.....	76
3.8.2	Procedimiento.....	77
3.9	Determinación de la capacidad antioxidante TEAC – ABTS por el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).....	79
3.9.1	Preparación de la solución ABTS* radical.....	79
3.9.2	Solución de Trolox y construcción de la curva patrón.....	79
3.9.3	Análisis estadístico .....	83



**CAPÍTULO IV****RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1	Caracterización de los compuestos bioactivos en frutos del mio mio ( <i>Coriaria ruscifolia</i> L) .....	84
4.2	Determinación del contenido de antocianinas y polifenoles totales, en frutos del mio mio ( <i>Coriaria ruscifolia</i> L). .....	98
4.3	Determinación de la capacidad antioxidante, en frutos del mio mio ( <i>Coriaria ruscifolia</i> L). .....	106
CONCLUSIONES .....		110
RECOMENDACIONES .....		112
BIBLIOGRAFÍA .....		113
ANEXOS .....		127

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
1. Contenido de fenoles totales de algunos alimentos. ....	17
2. Cuantificación de antocianinas en diferentes frutos y vegetales. ....	21
3. Métodos de extracción de antocianinas. ....	25
4. Bandas de absorción de las antocianinas más comunes .....	27
5. Valores de absorción para las BI y BII de los diferentes tipos de flavonoides.....	29
6. Regiones del espectro infrarrojo .....	32
7. Frecuencias de absorción características del infrarrojo .....	35
8. Temperatura y proceso de conservación de materia prima.....	57
9. Preparación de los gradientes de la fase móvil. ....	62
10. Condiciones para el análisis de HPLC.....	62
11. Valores para la determinación de contenido de antocianinas totales (CAT) en extractos de frutos de mio mio fresco.....	75
12. Datos para la obtención de la curva de calibración de fenoles totales.....	77
13. Concentraciones de trolox para elaborar la curva de calibración. ....	79
14. Volúmenes y concentraciones de Trolox y ABTS* diluido. ....	80
15. Absorbancias de extractos de frutos del mio mio fresco .....	81
16. Espectros FTIR – ATR ( $\text{cm}^{-1}$ ) con sus respectivas asignaciones de grupos funcionales .....	94
17. Contenido de Antocianinas Totales CAT (mg cianidina 3-glucosido/100g) en extractos de frutos del mio mio.....	99

18. Variación en los contenidos de antocianinas totales (CAT) en extractos de frutos del mio mio en diferentes estados de conservación..... 100

19. Contenido de Polifenoles totales PFT (mg ácido gálico / 100g) ..... 103

20. Variación en los contenidos de polifenoles totales (PFT) en extractos de frutos del mio mio en diferentes estados de conservación..... 103

21. Determinación de capacidad antioxidante por el método TEAC - ABTS, de

22. Variación en los contenidos de TEAC-ABTS en extractos de frutos del mio mio en diferentes estados de conservación..... 107



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
1. Mío – mío ( <i>Coriaria ruscifolia</i> L) .....	4
2. Mío – mío ( <i>Coriaria ruscifolia</i> L) de hojas, flores y frutos.....	4
3. Mío – mio, <i>Coriaria ruscifolia</i> L. ....	5
4. Esquema de clasificación de polifenoles .....	14
5. Estructuras básicas de los flavonoides .....	15
6. Estructura básica de un flavonoide .....	18
7. Estructura y sustituyentes de las antocianinas .....	19
8. Estructura más común de la antocianina glucosilada .....	20
9. Estructura molecular de algunas antocianidinas comunes.....	20
10. Reacciones de la transformación estructural de malvidina-3-glicosido en el intervalo de pH 1 a 7. ....	23
11. Bandas de absorción UV de flavonoides .....	28
12. Espectros de absorción UV-Vis de diferentes tipos de flavonoides con modelos de hidroxilación equivalentes .....	30
13. Espectro ultravioleta-visible de extracto metanólico de <i>R. adenotrichus</i> . ....	31
14. Espectro de absorción: curva A, pelargonidina 3: 5 - diglucósido; Curva B, pelargonidina diglucósido 3: 5 Acilado con ácido p-cumárico; Curva C, Pelargonidina 3 - monoglucósido. Las concentraciones de Los pigmentos eran de aproximadamente 50 uM, en solución metanolica 0-01% (p / v) HCl .....	31
15. Espectro infrarrojo de la fracción de un colorante flavínico .....	36
16. Cromatograma típico de Antocianinas de un vino cv. Carménère (520 nm) .....	40
17. Cromatograma general y perfil de antocianos a 520 nm de la fresa.....	40
	x

18. Barrido UV-Vis a 520 nm del cromatograma de <i>Vitisvinifera</i> L. c.v. “Red Globe” correspondiente a Cianidina 3-glucósido.....	41
19. Características espectrales de la antocianina de arándanos en tampones a pH 1.0 y 4.5.....	42
20. Estructura de antocianinas a diferentes valores de pH .....	43
21. Reacción del ácido gálico con molibdeno, componente del reactivo Folin – Ciocalteu .....	44
22. Oxidación de ABTS por persulfato potásico para generar catión radical ABTS • + y su reacción con un compuesto antiradical (AOH).....	46
23. Hojas y frutos (izquierdo), frutos frescos (medio) y frutos secos (derecho) del mio – mio ( <i>Coriaria ruscifolia</i> L).....	55
24. Cromatogramas de HPLC de antocianidinas en uva morada y fresa usados como patrón o estándar.....	71
25. Reporte de espectros UV Visible a 520 nm de antocianidinas de uva y fresa por HPLC. Donde: .....	72
26. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	77
27. Curva patrón de trolox.....	80
28. Curva patrón de trolox.....	81
29. Espectros UV – Vis de antocianinas en extractos de frutos del mio mio fresco (MMF) indicando, (arriba) $\lambda_{max}$ en Banda I y (abajo) $\lambda_{max}$ Banda II .....	85
30. Espectros UV – Vis de antocianinas en frutos de mio mio seco (MMS), indicando (arriba) $\lambda_{max}$ en Banda I y (abajo) $\lambda_{max}$ Banda II .....	86
31. Espectro FTIR de antocianinas en extractos de frutos del mio mio fresco.....	88
32. Espectro FTIR de antocianinas en extractos de frutos del mio mio seco. ....	89

33. Cromatograma del extracto de frutos del mio mio. Columna Eclipse XDB-C18, detección a 520 nm. .... 96

34. Resultados de espectros UV – Vis de antocianidinas del cromatograma HPLC de extracto de frutos del mio mio siendo los espectros de muestras (color azul) y de los estándares (color rojo) A: tR = 6.547 min y B: tR = 6.947 min. .... 97

35. Comparación de (CAT) en extractos de mio mio fresco, congelado y seco..... 99

36. Comparación de (PFT) Polifenoles Totales en extractos de frutos de mio mio. .. 104

37. Comparación de capacidad antioxidante TEAC-ABTS\* en extractos de frutos de mio mio. .... 107



## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pag.</b>
1. Frutos del mio mio (coriaria ruscfolia l.) fresco. ....	128
2. Extracción y filtración de pigmentos antociánicos de muestras de frutos de mio mio. ....	129
3. Extracción de pigmentos antociánicos de muestras de frutos de mio mio en equipo rotavapor a presión reducida. ....	130
4. Hidrólisis ácida y purificación de extractos de antocianinas con C-18. ....	131
5. Espectrofotometría UV – Visible de antocianinas para caracterizar antocianinas. .	132
6. Espectrómetro FTIR – ATR de antocianinas. ....	133
7. Contenido de antocianinas Totales CAT por método pH diferencial. ....	134
8. Contenido de Polifenoles Totales PFT (Método Folin Ciocalteu). ....	135
9. Capacidad antioxidante TEAC – ABTS* . ....	136
10. Tabla de frecuencias de vibración FTIR. ....	137

## RESUMEN

Ante la creciente demanda de colorantes naturales a nivel mundial, se ha estudiado los extractos de los frutos del (mio mio) *Coriaria ruscifolia* L. del cual se tiene escasa información, encontrando en ellos compuestos antociánicos y polifenólicos los mismos que son de gran interés como compuestos bioactivos por poseer capacidad antioxidante. Actualmente se tiene conocimiento de que los flavonoides entre ellos las antocianinas que contienen los frutos del mio mio tiene propiedades anticancerígenas y otras propiedades funcionales que hacen de gran interés su estudio los mismos que pueden ser usados como una gran fuente de antioxidante como colorantes naturales. El objetivo del presente estudio es determinar los compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de los frutos del mio mio para su uso en la industria alimentaria. Se efectuó la extracción de sus pigmentos con Metanol acidificado y en este extracto se determinó sus características antociánicas por espectroscopia UV Visible, FTIR-ATR, luego se determinó la composición de sus antocianinas por HPLC. Se determinó el contenido de antocianinas totales CAT por método de pH diferencial siendo de 440.22 (mg de cianidina 3-glucosido/100 g), además se cuantificó el contenido de polifenoles totales PFT usando el método Folin-Ciocalteu habiéndose determinado 1820.41 (mg ácido gálico/100 g), también se ha evaluado su capacidad antioxidante TEAC – ABTS cuyo resultado fue de 739.92 (umol trolox/100 g). Los resultados de los compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de los extractos de frutos del mio mio son notablemente mayores a los reportados por diferentes frutos similares, lo que implica concluir que estos frutos pueden ser usados como una fuente de antioxidantes en forma de colorantes naturales.

**Palabras clave:** antioxidantes, antocianinas, capacidad antioxidante, flavonoides, polifenoles y radicales libres.

## ABSTRACT



The Natural dye demand is growing worldwide. This research is about the extracts of the fruits of (Mio mio) *Coriaria ruscifolia* L., from which little information is available, but we found in them anthocyanic and polyphenolic compounds which are great interest as bioactive compounds because of their antioxidant capacity. Nowadays, It is known that flavonoids including anthocyanins from (Mio mio) fruit has anticancer properties and other functional properties that made this study a great interest and can be used as a great source of antioxidant as natural dyes. The objective of the present study was to determine the bioactive compounds and antioxidant capacity of (Miomio) fruit to use in the food industry. The extraction of their pigments were carried out with acidified methanol and into this extract their anthocyanin characteristics were determined by Visible UV spectroscopy, FTIR-ATR, then the composition of their anthocyanins were determined by HPLC. The content of total CAT anthocyanins were determined by differential pH method. This 440.22 (mg of cyanidin 3-glucoside / 100 g) in addition the total content of polyphenols PFT were quantified using the Folin-Ciocalteu method with 1820.41 (mg gallic acid / 100 g). The antioxidant capacity TEAC - ABTS has also been evaluated with 739.92 (umoltrolox / 100 g). The results of the bioactive compounds and antioxidant capacity of (miomio) fruit extracts were notably higher than those reported by different similar fruits. This implies as a conclusion that these fruits can be used as a source of antioxidants in the form of natural dyes.

**Key words:** Antioxidants, anthocyanins, antioxidant capacity, flavonoids, polyphenols and free radicals.

## INTRODUCCIÓN

Los frutos pigmentados no solo son valiosos por sus contenidos en Vitamina C y algunos macro y micronutrientes y minerales sino también por sus compuestos bioactivos como los flavonoides entre ellos las antocianinas, por su alto valor antioxidante quienes neutralizan los radicales libres generados en el organismo humano, esta actividad ha sido ampliamente estudiado o relacionado por su contenido en compuestos fenólicos (Seeram, 2008b). Investigaciones efectuadas al respecto han determinado que el consumo frecuente de alimentos con alto contenido de estos compuestos previene malformaciones celulares degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, envejecimiento celular, etc.(Zorrilla García, 2002).Estos antioxidantes de frutos antociánicos poseen capacidad para neutralizar los radicales libres permitiendo que las células no sufran oxidación o que se mantengan en un equilibrio para los procesos de óxido-reducción que ocurren en forma natural dentro del organismo(E Marta Kuskoski, Asuero, García-Parilla, Troncoso, & Fett, 2004) .

Existen trabajos de investigación que indican que el contenido de flavonoides del tipo polifenoles especialmente antociánicos en las plantas, se deben a muchos factores extrínsecos como el grado de la intensidad de la luz UV e intrínsecos como la variedad de una planta, factores ambientales como el cambio climático actual, de almacenamiento como la senescencia de los frutos y procesamiento como es la oxidación de algunos de sus compuestos los mismos que se deben tener en consideración(Balasundram, Sundram, & Samman, 2006).

Estudios de extractos en fuentes naturales con alto contenido en flavonoides en la actualidad son de creciente interés para la industria alimentaria porque también retardan la oxidación lipídica y de esta manera pueden mejorar la calidad y el valor nutricional de los alimentos y de esta manera evitar el uso de sustancias antioxidantes artificiales como el BHT (butil hidroxil tolueno) y el BHA (butil hidroxil anisol) actualmente cuestionados por los posibles efectos toxicológicos adversos que pueden presentar como las disfunciones endocrinas y que es menester seleccionar otras fuentes de antioxidantes lipídicas naturales y aceptadas por los consumidores y no requerir pruebas de seguridad por la legislación, entre otros(Olmedo, Asensio, Nepote, Mestrallet, & Grosso, 2009).

Siendo el Perú un país megadiverso, cuenta con una serie de frutos aun no bien estudiados como son los frutos del mio mio, las mimas que desde tiempos pre-incas ya han sido usados como tintes naturales (Chacón & Octavio, 2015), hoy ante la gran demanda de alimentos funcionales se debe estudiar sus componentes bioactivos y de esa manera dar su valor agregado en los pobladores de la región andina efectuando el uso masivo de colorantes naturales con efectos antioxidantes para uso alimentario (Pokorny, Yanishlieva, & Gordon, 2005). Los frutos con contenido alto en flavonoides y sustancias poli fenólicas, son los que están relacionados con una gran capacidad antioxidante de efecto bioactivo (Héctor, Clavijo, & Herrera, 2006), los mismos que son evaluados en los extractos de los frutos del mio mio (*Coriaria ruscifolia* L).

Existen estudios en 56 plantas tintóreas en el Perú, entre ellas el mio mio (*Coriaria ruscifolia*L) que se ha usado como tintes naturales para teñir telas y otros objetos tiene una larga historia en los andes sudamericanos, pero se ha perdido casi toda la tecnología con la introducción de los tintes sintéticos (de Mayolo, 1989).

Actualmente el miomio se encuentra en el Perú como arbusto silvestre usado generalmente como material de cerco en las vivienda rurales y su uso alimentario de sus frutos maduros es precario generalmente entre los meses de marzo a junio, por lo que se considera un arbusto poco difundido y al que no se le ha dado su verdadero valor agregado como sustancias con alto potencial bioactivo del cual se pueden obtener colorantes naturales ya que se tiene en forma abundante en las regiones de Apurímac, Huancavelica y Cusco.

Dentro de los frutos más difundidos y reconocidos por su alto contenido antioxidante y valor comercial se tiene los arándanos o blueberry (*Vaccinium corymbosum*) (Ribera, Reyes-Díaz, Alberdi, Zuñiga, & Mora, 2010), pero se tienen escasa información de las propiedades bioactivas del mio mio (*Coriaria ruscifolia* L) por lo que es materia de estudio en el presente trabajo de investigación para poder usarlas eventualmente como fuente natural de antioxidantes.

## CAPÍTULO I

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 1.1. Marco Teórico.

##### 1.1.1. Características Botánicas del mio mio

*Coriaria ruscifolia* L. (mio - mio) saca saca, (Shalisko, González-Villarreal, & Carvajal, 2007), forma gran parte de la flora silvestre del distrito de Tamburco, Abancay, Apurímac, Perú, crece desde los 2400 – 2900 msnm, se encuentra en flor y fruto durante casi todo el año, da frutos en cantidades considerables con más alta producción los meses de mayo – junio, secándose en la propia planta al no tener aprovechamiento, más bien es usado como cercos limítrofes en algunas propiedades del lugar. Se tiene información que los frutos de este arbusto son usados como tintes naturales para el teñido artesanal de lanas y fibras (Lock Sing de Ugaz, 1997).

El mio – mio (*Coriaria ruscifolia* L), es una especie que pertenece a la familia Coriariaceae. Es un arbusto o árbol más bien pequeño, hasta de 7 m de alto, con las ramas extendidas (Figura 1 y 2); hojas sésiles o subsésiles, las de los tallos principales opuesto-cruzadas, ovadas a cordiformes o suborbiculares, a veces más anchas que largas, abrazadoras en la base, con 5 a 9 nervaduras basales, las de las ramas laterales oblongo-ovadas a elípticas o lanceoladas, de 0,5 a 7,5 cm de largo y de 0,2 a 3,2 cm de ancho, ápice agudo a acuminado o mucronado, base cuneada; racimos con frecuencia largos y delgados, hasta de 25 cm de longitud, pubérulos, originándose en las ramas principales, o bien en las laterales; flores sobre pedicelos delgados, de 2 a 6 mm de largo, acompañados por una bráctea basal; flores de 2 a 3 mm de diámetro, hermafroditas, de color rojizo

oscuro con verde, amarillentas o blanquecinas; sépalos ovados, de 1.5 a 2 mm de largo y 1 a 1,5 mm de ancho; pétalos más cortos que los sépalos; fruto subgloboso, de 3 a 4 mm de diámetro, de color oscuro, conteniendo por lo común 5 cocos rodeados por los pétalos carnosos acrescentes (Calderón de Rzedowski, 1992).



Figura 1. Mío – mío (*Coriaria ruscifolia* L)

Fuente: <http://www.botanicayjardines.com/coriaria-ruscifolia/>

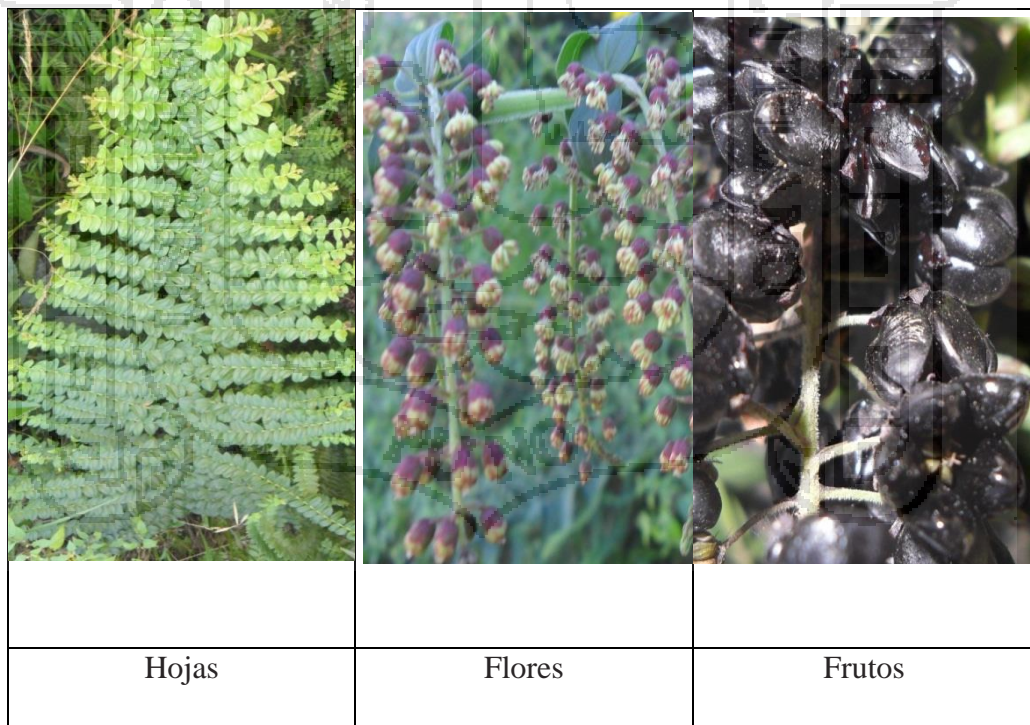


Figura 2. Mío – mío (*Coriaria ruscifolia* L) de hojas, flores y frutos.

Fuente: <http://www.chileflora.com/Florachilena/FloraEnglish/HighResPages/EH0105.htm>

Los frutos del mio – mio (Figura 2) son usados en el Perú, como tintes naturales para teñido (Lock Sing de Ugaz, 1997).



Figura 3. Mio – mio, *Coriaria ruscifolia* L.  
Fuente: (Rodríguez *et al.*, 2017).

### 1.1.2. Taxonomía del mio – mio (*Coriaria ruscifolia* L)

El mio-mio (Figura 3) pertenece a las siguientes categorías taxonómicas (Santa Cruz Cervera, 2011).

Reino: Plantae  
 Subreino: Tracheobionta  
 División: Magnoliophyta  
 Clase: Magnoliopsida  
 Subclase: Magnoliidae  
 Orden: Cucurbitales  
 Familia: Coriariaceae  
 Género: Coriaria  
 Especie: *C. ruscifolia* L.

### **1.1.3. Distribución**

Amazonas, Apurímac, Ayacucho, Cajamarca, Cuzco, Huánuco, Huancavelica, Junín, La Libertad, Puno. Se distribuye de México a Sudamérica, también en Nueva Zelanda, Nueva Guinea y otras islas del Pacífico (Shalisko et al., 2007), (Guédès, 1971).

### **1.1.4. Nombres comunes**

Mío-mío, chanche, chanchí, llama-myo, mío, miyo-miyo, milloghya, saca-saca, zumaque.

### **1.1.5. Usos**

Como tinte natural para la fibra y para curtir. Del jugo del fruto se extrae un tinte muy firme de color morado intenso y de las hojas se obtiene tanino para curtiembre. Para el teñido se usa los frutos maduros que por lo general son cosechados en el mes de julio. El color de colorante obtenido varía entre azulado a morado y color vino (Cajías & Fernandez, 1987)

### **1.1.6. Pigmentos en plantas tintóreas.**

Los pigmentos en plantas vegetales provienen generalmente por diferentes componentes bioactivos que no necesariamente guarda relación entre el color de la planta y el colorante que contiene. El hecho de que una molécula biológica este o no coloreada viene determinado por su estructura y de acuerdo a sus afinidades estructurales y se han clasificado los colorantes orgánicos en seis grandes grupos en la tintorería tradicional americana son cinco los grupos que interesan, carotenoides y flavonoides (amarillos anaranjados), antocianinas (azules y rojos), quinonas (púrpura escarlata) indigoides (azul y púrpura) (Cajías & Fernandez, 1987).

### **1.1.7. Compuestos fenólicos**

Los componentes fenólicos constituyen uno de los grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal, que forman parte importante de la dieta humana.

Dentro de la clasificación general se encuentran los fenoles, ácidos fenólicos y flavonoides, que constituyen un amplio grupo de sustancias químicas consideradas metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y propiedades (Porras-Loaiza & López-Malo, 2009).

- **Fenoles:** Los polifenoles son importantes antioxidantes en la dieta y la papa es una buena fuente de ellos, tienen un amplio rango de características promotoras de la salud. Estudios han revelado que las papas son consideradas la tercera fuente de fenoles después de manzanas y naranjas. Estos compuestos están presentes tanto en la cascara como en la pulpa de las papas. Hoy en día hay un creciente interés por consumir papas nativas, sobre todo las que tienen pulpas rojas o púrpuras, ya que sus pulpas contienen 3 a 4 veces más concentración de fenoles que las papas más comerciales de pulpas crema o blanca (M. Muñoz, 2014).
- **Flavonoides:** También son compuestos con actividad antioxidante y por lo tanto, promotores de la salud. La papa no contiene tantos flavonoides si se le compara con otros alimentos, pero su alto consumo hace que sea una buena fuente de ellos. Al igual que lo que sucede con los fenoles, las papas de pulpas rojas o púrpura contienen más concentración y se están comenzando a utilizar como fuente de colorantes naturales y antioxidantes en la industria alimenticia, sobre todo para reemplazar a los colorantes artificiales y así mejorar la salud humana (M. Muñoz, 2014).

En un estudio realizado con 1000 genotipos de papas andinas por el Centro Internacional de la Papa en Perú (CIP), se determinó que los ácidos fenólicos, en especial la concentración del ácido clorogénico, representaron una gran proporción en todos los genotipos, entre el 45% y 90% del total del contenido de polifenoles (Andre *et al.*, 2007).

En la investigación con doce papas nativas chilenas procedentes de las islas de Chiloe y Valdivia se evaluó el contenido de polifenoles totales por el método de Folin - Ciocalteu en papas con cáscara y sin cáscara, observándose que existe una variación en las muestras de papas peladas y sin pelar.



En papas sin cáscara, el rango de polifenoles totales fue de 191 a 1864 mg /100 g en base seca (BS) mientras tanto estos parámetros variaron desde 345 a 2852 mg /100 g en BS en papas con cáscara (Ah-Hen *et al.*, 2012), lo que indica una elevada concentración de polifenoles en la cáscara de los tubérculos.

Otro factor que se puede correlacionar con el contenido de polifenoles son las coloraciones rojas y púrpuras de la cáscara del tubérculo, las cuales pueden llegar a contener el doble de la concentración de ácidos fenólicos en comparación con variedades de cascara blanca (Ezekiel, Singh, Sharma, & Kaur, 2013), las cuales son las de mayor consumo.

Esta característica del color de cáscara de los tubérculos sobresale en las papas nativas andinas silvestres donde se encuentran diferentes tonalidades entre papas de color amarillo, rojas y púrpuras.

#### **1.1.8. Antocianinas**

El otro gran grupo de pigmentos que pueden presentarse en los tubérculos de algunas variedades de papa son las antocianinas. Se trata de pigmentos vacuolares que dan lugar a las coloraciones rojas a púrpura negras en la piel de los tubérculos y/o en la pulpa y estos colores a menudo enmascaran los colores producidos por los carotenoides. Las antocianinas pertenecen a una clase de compuestos llamados flavonoides, sin embargo la mayoría de los flavonoides es generalmente incolora o tienen un color amarillo. Otros flavonoides, tales como los flavonoles y las flavonas que tienen un color amarillo y pueden estar presentes en trazas, aunque es poco probable que tengan un efecto significativo sobre la pulpa o el color de la cáscara (Burton, 1989).

#### **1.1.9. Carotenoides**

La pulpa de todas las variedades de papa está teñida de amarillo en mayor o menor grado, y esto se debe principalmente a la presencia de carotenoides, una clase de pigmentos y plastidios. Los principales constituyentes de carotenoides en los tubérculos de patata son las xantofilas, violaxantina, luteína y luteína-5,6-epóxido, con pequeñas cantidades de neoxantina y neoxantina-A (Burton, 1989).

## 1.2. Alimentos funcionales

### 1.2.1. Alimento nutracéutico

Es aquel que contiene compuestos que se ha demostrado que tienen efectos positivos en nuestra salud y que incrementan nuestra calidad de vida. Es cualquier sustancia que puede ser considerada un alimento o la parte de un alimento que provee un beneficio para la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de una enfermedad.

Son productos de origen natural con propiedades biológicas activas, beneficiosas para la salud y con capacidad preventiva y/o terapéutica definida. Los alimentos nutracéuticos previenen las principales enfermedades crónicas degenerativas que son los infartos, embolias, hipertensión, diabetes, cánceres hormona dependientes (glándulas mamarias, próstata, tiroides, etc.) (Delgado-Vargas & Paredes-López, 2002).

Los alimentos nutracéuticos se dividen en:

- Nutrientes: Estos son los azúcares y las grasas.
- Compuestos químicos: Fibras, antioxidantes, carotenos, ácidos grasos (Omega-3)
- Probióticos: microorganismos benéficos (lácteos).

Los criterios que deben cumplir los alimentos nutracéuticos son que:

- Sean productos de origen natural.
- Aislados y purificados por métodos no desnaturalizantes
- Que aporten efectos beneficiosos para la salud:
  - a. Mejora de una o más funciones fisiológicas.
  - b. Acción preventiva y/o curativa.
  - c. Mejora de la calidad de vida.
- Que se preserve su calidad en el tiempo.
- Con análisis de estabilidad y toxicología.
- Análisis químicos.
- Estudios reproducibles de sus propiedades bioactivas (McDonough, Rooney, & Serna-Saldívar, 2000).

### 1.2.2. Radicales libres

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración inestable, señalado por el punto situado a la derecha del símbolo. Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cerca al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar (Mariella & Anita, 2011).

Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas que están presentes al mismo tiempo en todas partes y además difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo.

No obstante lo expresado anteriormente, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como la de participar en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, favorecen la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modifican la biomembrana y favorecen la quimiotaxis (Aguilera-Otíz, del Carmen Reza-Vargas, Chew-Madinaveita, & Meza-Velázquez, 2011), (Mariella & Anita, 2011).

Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicalares, pero que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes prooxidantes y son las especies reactivas del oxígeno (EROS) (Naqui, Chance, & Cadenas, 1986).

Las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son:

- Radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ )
- Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )
- Anión superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ )
- Oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ )
- Oxígeno nítrico ( $\text{NO}\cdot$ )

- Peróxido (ROO ·)
- Semiquinona (Q)
- Ozono ( O<sub>3</sub> )

### 1.2.3. Compuestos antioxidantes

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de un sustrato oxidable, actuando como donador de electrones (agente reductor). Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía, liberan radicales libres, lo cual es incompatible con la vida a menos que existan mecanismos celulares de defensa que los neutralice. A estas defensas se las denomina antioxidantes. Los niveles bajos de los mismos, o la inhibición de las enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo y pueden dañar o matar las células. Se clasifican de la siguiente manera:

- **Endógenos:** son normalmente bio-sintetizados por el organismo como las enzimas: catalasa, superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasas, tioredoxina-reductasas y sulfoxido-metionina-reductasas.
- **Exógenos:** a través de la dieta no enzimáticos como las las vitaminas E y C, los beta-carotenos, flavonoides y licopenos, fitoestrógenos, polifenoles, glutatión, ácido úrico, ubiquinol (Co-enzima Q) y melatonina. Además de las vitaminas los oligoelementos como cobre, zinc, manganeso, selenio y hierro deben ser incorporados al organismo a través de la dieta, porque conforman la parte activa del núcleo de las enzimas antioxidantes.

### 1.2.4. Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. En términos químicos, es un gran aumento en la reducción del potencial celular o una disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares como el glutatión.

Un aspecto “destrutivo” del estrés oxidativo es la producción de especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO), que incluyen los radicales libres y los peróxidos.

La mitocondria es el principal productor de especies reactivas de oxígeno durante los procesos normales oxidativos del metabolismo, principalmente a través de las reacciones de óxido-reducción que ocurren en los complejos de transferencia de electrones y que tienen al oxígeno como el último aceptor de electrones (Macedo-Márquez, 2012).

Ante el peligro que representa el daño oxidativo, las células se encuentran preparadas con mecanismos de protección: los antioxidantes celulares son las enzimas por ejemplo la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Miquel & Ramírez-Boscá, 2004).

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio prooxidante/antioxidante, a favor del primero. Se menciona (Miquel & Ramírez-Boscá, 2004) que, el aumento del estrés oxidativo que tiene lugar al envejecer, se acompaña de un progresivo descenso en los niveles tisulares de glutatión reducido (necesario para la síntesis de DNA y proteínas, actividades enzimáticas, liberación de neurotransmisores y detoxificación de compuestos carcinógenos)

El estrés oxidativo ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas. Por esta razón, se estudia de forma intensiva el uso de antioxidantes, especialmente los flavonoides (antocianina) que demuestran su capacidad antioxidante y su contribución significativa en la dieta, así como su efecto en la prevención de diversas enfermedades como cardiovasculares, cancerígenas y neurológicas (Brown, 2005; E Marta Kuskoski et al., 2004; Reyes, Miller, & Cisneros-Zevallos, 2004). Sin embargo, se desconoce si el estrés oxidativo es la causa o la consecuencia de tales enfermedades (Sies, 1997). Numerosos trabajos han estudiado la implicancia de las especies reactivas de oxígeno (ERO's) en el desarrollo de patologías humanas, especialmente en relación a enfermedades cardiovasculares, neurológicas, inflamatorias, cáncer y en los procesos de envejecimiento (Ames, Shigenaga, & Hagen, 1993; Halliwell, 1996).

### **1.2.5. Capacidad antioxidante**

La actividad antioxidante es la capacidad de una sustancia para inhibir la degradación oxidativa como la peroxidación lipídica, de tal manera que un

antioxidante actúa, principalmente, gracias a su capacidad para reaccionar con radicales libres (Londoño Londoño, 2012).

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se basan en comprobar si un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra. Por otra parte, hay ensayos que se basan en la cuantificación de los productos formados tras el proceso oxidativo.

Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en la medida del punto final, en la técnica instrumental utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción (soledad fernandez-pachon, villafio, troncoso, & garcía-parrilla, 2006).

Existen varias aproximaciones para la clasificación de métodos para medir actividad antioxidante, una de ellas se basa en clasificar los métodos como directos e indirectos. Los métodos directos están basados en el estudio del efecto de un antioxidante sobre la degradación oxidativa de un sistema, de los cuales los más usados han sido: proteínas, ácidos nucleicos, plasma sanguíneo, grasas, lipoproteínas, membranas biológicas, entre otros. En los métodos indirectos se estudia la habilidad del antioxidante para estabilizar algún radical libre, de hecho, se ha popularizado el uso de algunos radicales libres meta estables, coloreados, con fuerte absorción en el espectro visible, como herramienta para determinar la actividad estabilizadora de radicales libres, estos son por ejemplo DPPH• y ABTS•+ (Londoño Londoño, 2012). Los métodos ABTS•+ y DPPH• presentan una excelente estabilidad durante las reacciones (E Marta Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho, & Fett, 2005).

#### **1.2.6. Compuestos fenólicos**

Son sustancias denominadas metabolitos secundarios de las plantas que son de gran importancia en la dieta humana y animal por haberse encontrado en investigaciones que contrarrestan la oxidación generada por radicales libres.

El término compuesto fenólico engloba más de 8000 compuestos con una gran diversidad estructural, aunque todos ellos poseen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Los polifenoles se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural (Creus, 2004). Según su estructura química se tienen como en la figura 4 y 5:

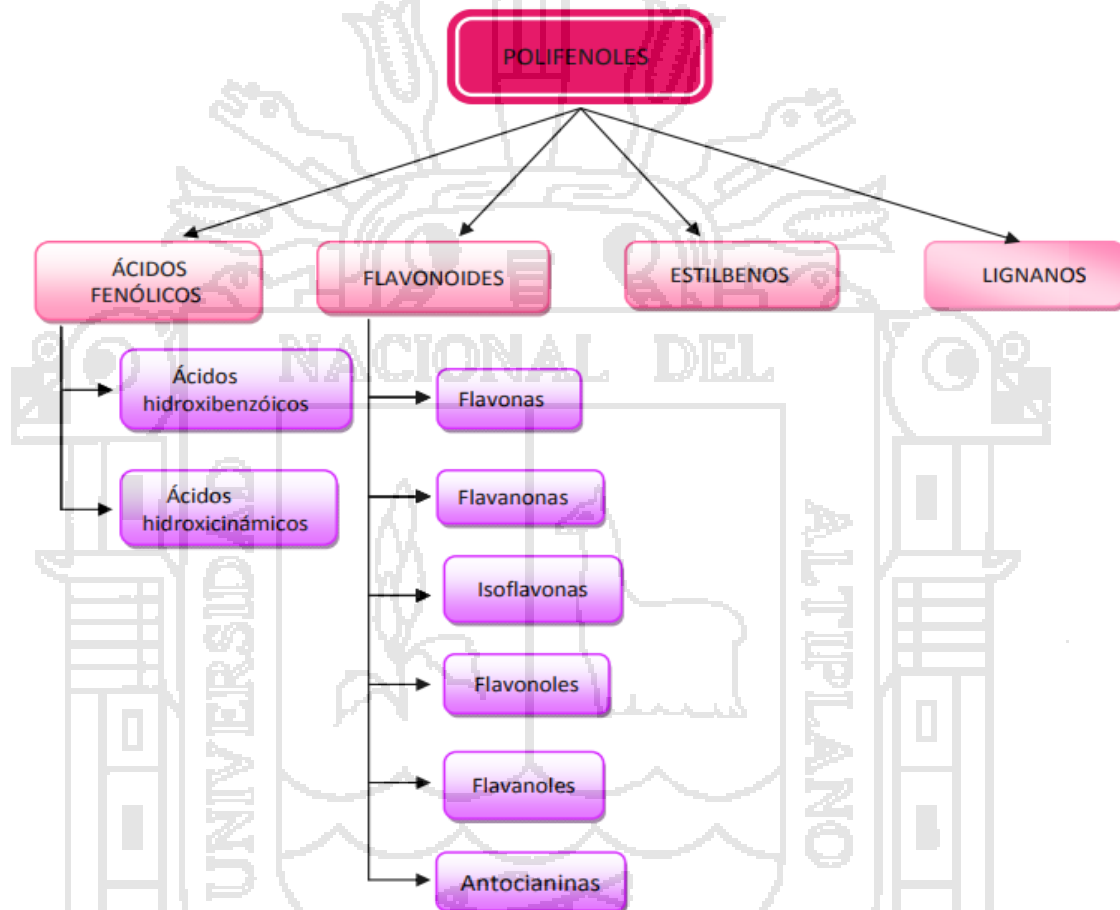


Figura 4. Esquema de clasificación de polifenoles  
Fuente: (Collado González, 2011).

Se presentan las principales estructuras de grupos de flavonas, flavonoles, flavononas, flavonoles, etc.

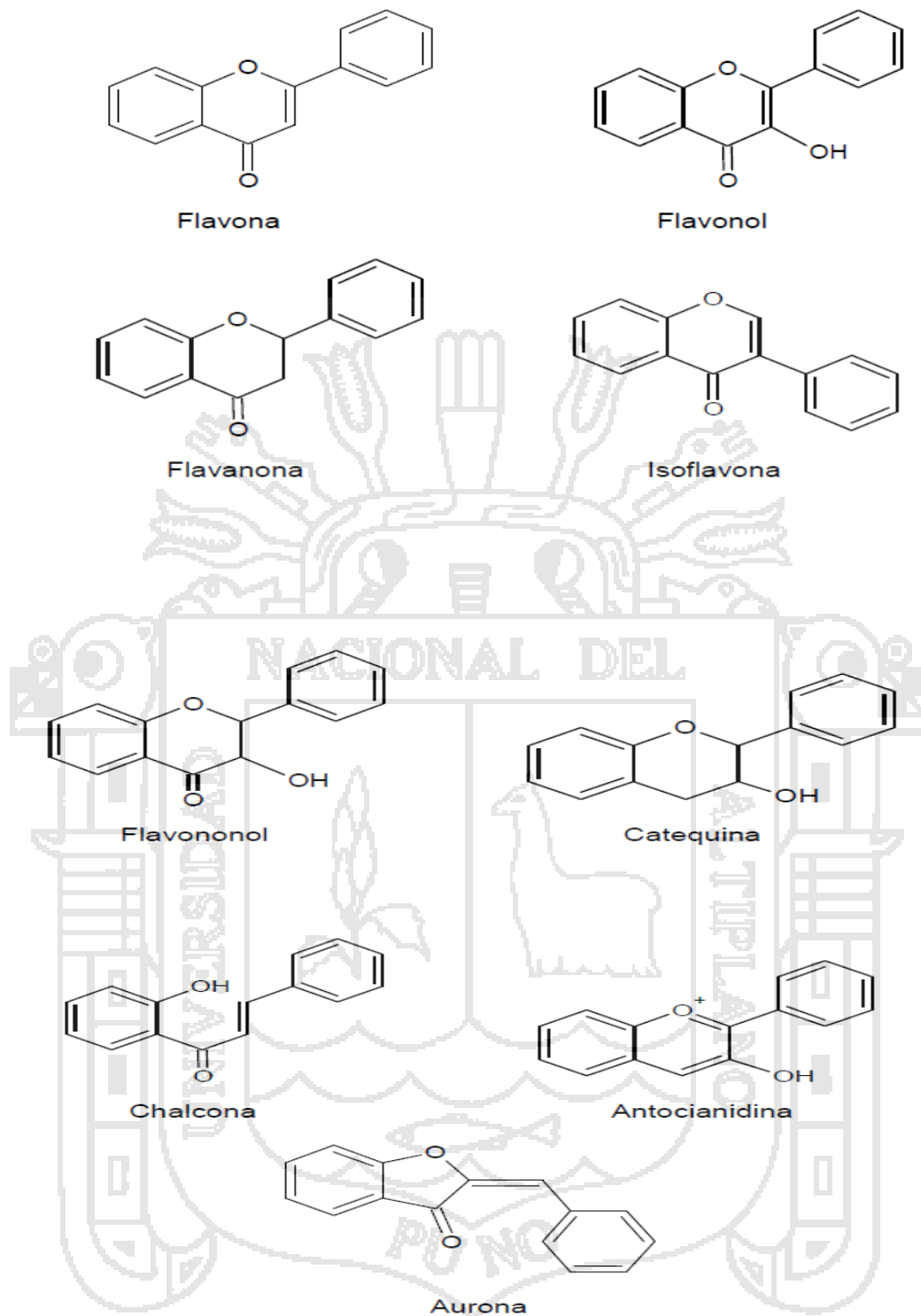


Figura 5. Estructuras básicas de los flavonoides  
Fuente: (Martínez García, 2014).



### 1.2.7. Polifenoles

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos con funciones hidroxílicas; se encuentran en muchas plantas, algunas de uso común y por sus propiedades antioxidantes merecen mayor atención (Ángel & González, 1999).

Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos y flavonoides (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012).

Generalmente, los alimentos contienen una mezcla compleja de polifenoles, existiendo numerosos factores medioambientales como la luz, el grado de madurez o el grado de conservación, pueden afectar al contenido total de polifenoles. El clima (exposición al sol, precipitaciones, etc.) o factores agronómicos (diferentes tipos de cultivos, producción de fruta por el árbol, etc.) juegan un papel fundamental. La exposición a la luz es, en particular, uno de los principales condicionantes para determinar el contenido de la mayoría de los polifenoles. El grado de conservación puede también determinar el contenido en polifenoles fácilmente oxidables, permitiendo la formación de más o menos sustancias polimerizadas que afectan al color y a las características organolépticas de los alimentos. La conservación en frío, sin embargo, no afecta al contenido de polifenoles.

El contenido de polifenoles en los alimentos está también influenciado por los métodos culinarios de preparación; así, el contenido de polifenoles de las frutas y de los vegetales pueden disminuir por el simple hecho de pelar estos alimentos, ya que estas sustancias están a menudo presentes en altas concentraciones en las partes externas de los mismos. La cocción de los alimentos puede disminuir hasta un 75% el contenido inicial de polifenoles (van der Sluis, Dekker, de Jager, & Jongen, 2001), (Quiñones et al., 2012).

**Tabla 1.** Contenido de fenoles totales de algunos alimentos.

Fuente	Contenido de polifenoles totales PFT (mg ácido gálico/100 g)
<b>ESPECIES MOLIDAS</b>	
Clavo de olor	16550
Menta	491
Orégano	4980
Romero	
<b>FRUTAS</b>	
Arándanos	311
Banana	155
Cerezas	259
Ciruelas	332
Duraznos	133
Frambuesas	414
Frutillas	332
Kiwis	211
Limonos	51
Manzanas	250
Melones	56
Naranjas	57
Peras	178
Uvas	170
<b>VEGETALES</b>	
Ajo	92
Apio	42
Batata	74
Berenjena	63
Brócoli	316
Cebollas	23
Coliflor	93
Papas	163
Pepino	22
Perejil	77
Pimiento rojo	255
Remolachas	188
Repollo colorado	231
Tomate	80
Zanahorias	35
<b>LEGUMBRES</b>	
Lentejas	628
Maníes	396
Porotos	94
<b>BEBIDAS</b>	
Jarabe de chocolate	417
Vino blanco	20
Vino tinto Cabernet S.	203

Fuente: (Haytowitz & Bhagwat, 2010) USDA

Los antioxidantes de las plantas constituyen uno de los componentes activos de los alimentos, cuya fuente principal se encuentra en las diferentes partes de la planta, ya sea frutos, hojas, raíces y/o flores (Haytowitz & Bhagwat, 2010). En la Tabla 1 se muestra el contenido total de fenoles en algunos alimentos.

### 1.2.8. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos ( $C_6-C_3-C_6$ ) (Figura 6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (A. Martínez, 2005).

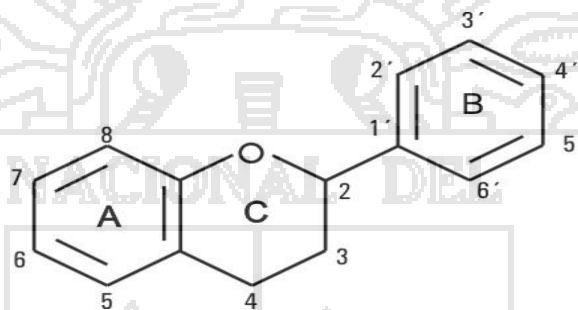


Figura 6. Estructura básica de un flavonoide  
Fuente: (A. Martínez, 2005).

Los flavonoides (Martínez-Flórez, González-Gallego, Culebras, & Tuñón, 2002) en función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

- Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C<sub>3</sub>.
- Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

### 1.2.8.1. Antocianinas

Las antocianinas son los compuestos químicos responsables de conferir los colores rojo, azul y violeta (Kalt et al., 2003) en hojas, flores y frutos, y son especialmente importantes en arándano. Estos compuestos pertenecen a la familia de los flavonoides. Son glucósidos de antocianidinas, es decir, que están constituidos por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace O-glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio, también llamado 2-fenilbenzopirilio, que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); ambos unidos por una cadena de tres átomos de carbono (Aguilera-Otíz et al., 2011). Variaciones estructurales del anillo B producen las seis antocianidinas conocidas que se observan en la figuras 7 y 9.

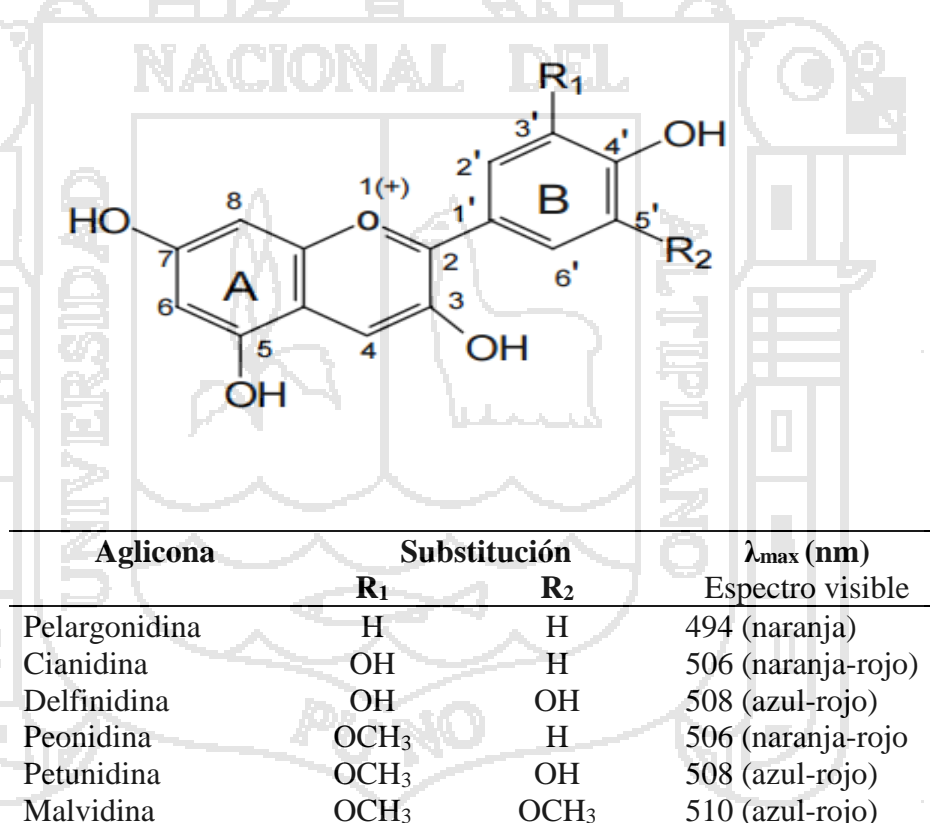


Figura 7. Estructura y sustituyentes de las antocianinas  
Fuente: (Durst & Wrolstad, 2001).

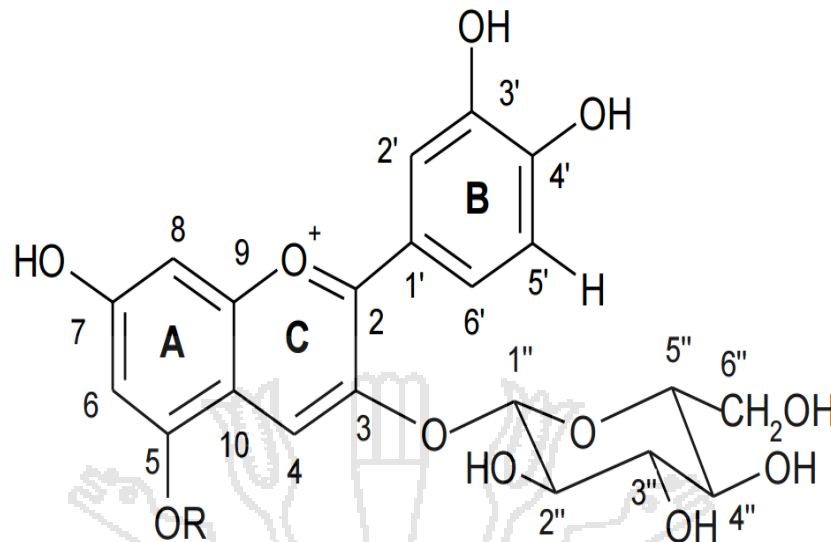


Figura 8. Estructura más común de la antocianina glucosilada  
Fuente: (Walford, 1980).

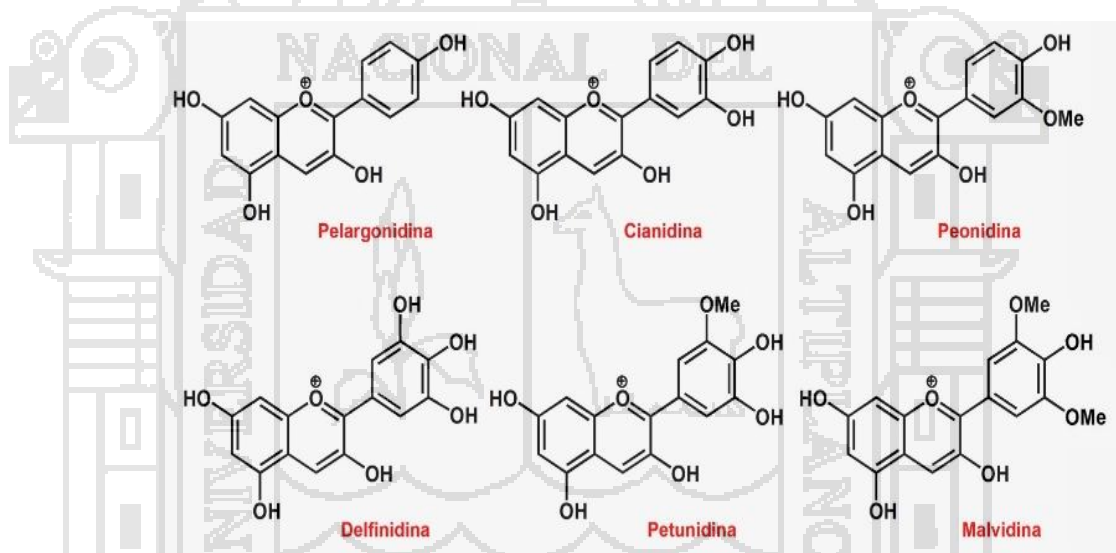


Figura 9. Estructura molecular de algunas antocianidinas comunes.  
Fuente: (Walford, 1980).

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula.

Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas.

En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas (Figura 8) en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad en agua. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos que pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: *p*-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico o *p*-hidroxibenzóico (Stintzing, Stintzing, Carle, Frei, & Wrolstad, 2002). El tipo de sustitución glicosídica y de acilación producen efectos en el tono de las antocianinas; las sustituciones glicosídicas en la posición 5 y las acilaciones aromáticas, producen un desplazamiento hacia las tonalidades púrpura (GARZÓN, 2008a).

Los compuestos antociánicos se acumulan en mayor cantidad en flores y frutos (principalmente en la cáscara), pero también están presentes en hojas en el tallo, órganos de almacenamiento, granos, algunas bayas y grosellas negras son consideradas como fuentes muy ricas en antocianinas, sin embargo la berenjena, granos pigmentados morados y azules, vino rojo también tienen altas concentraciones (Tabla 2) (Gross & Gross, 1987) (Vargas Simón, Soto Hernández, & Rodríguez González, 2002).

**Tabla 2.** Cuantificación de antocianinas en diferentes frutos y vegetales.

Material Vegetal	Unidades	Concentración de antocianinas
Arándanos	mg de malvidina-3-glucosido/100 g de muestra fresco	118.4
Mortiño	mg equivalentes de cianidin-3-glucosido/100 g de fruto fresco	200.6
Cerezas silvestres	mg de cianidina/100 g de fruto seco	3.34 – 141.94
Papas nativas	mg /100 g de fruto seco	150

Fuente: Muñoz et al., (2008), (C. Muñoz et al., 2008), (Gaviria et al., 2009), (Butkhup Samappito, 2008), (Barragan Condori & Aro Aro, 2017).

### 1.2.8.2. Estabilidad de antocianinas

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes artificiales, su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento (GARZÓN, 2008a), (Wrolstad, 2000), (Cevallos-Casals & Cisneros-Zevallos, 2004). Factores como su misma estructura química, pH, temperatura, presencia de oxígeno y ácido ascórbico, concentración y actividad de agua de la matriz determinan la estabilidad del pigmento.

- **Efecto del pH**

Las antocianinas son muy sensibles a los cambios de pH (Wong, 1994) esto debido a una deficiencia del núcleo del flavilio u oxonio que es la forma más estable de las antocianinas, estos pigmentos funcionan como verdaderos indicadores de pH; es decir, su color depende de las condiciones de acidez o alcalinidad del sistema en que se encuentran. A pH ácido adquiere una estructura estable del catión flavilio rojo, representado por la fórmula ( $AH^+$ ), cuando se incrementa el pH, la distribución electrónica se modifica hasta llegar a la forma quinoidea azul (A) o base anhidra (Ver figura 10); tanto la sal del flavilio como la base anhidra pueden convertirse a las especies pseudo base de carbinol o hemiacetal (B) incolora y bastante inestable, que predomina en el intervalo de pH de 4 a 6 (Badui, Bourges-Rodriguez, & Anzaldúa-Morales, 1999) y posterior oxidación a una calcona o chalcona de cadena abierta (C).

A pH superiores a 7 se produce la degradación rápida de las antocianinas que se presentan en las formas quinoideas de color púrpura los mismos que se degradan rápidamente por oxidación con el aire por lo cual, el uso práctico de estos pigmentos antociánicos como colorantes naturales se limita a alimentos ácidos con pH inferior a 3.5 (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez, & Galán-Vidal, 2009), (L. ZAPATA, 2014).

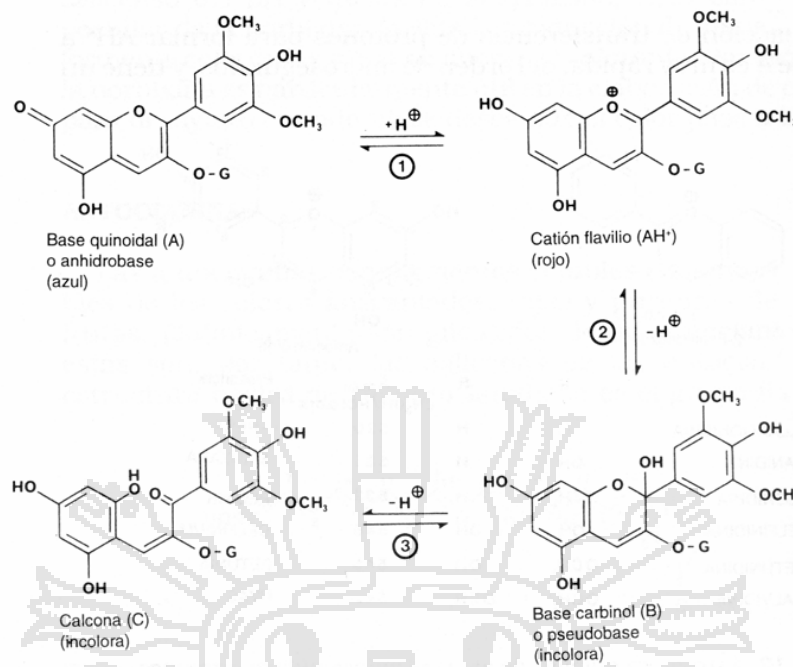


Figura 10. Reacciones de la transformación estructural de malvidina-3-glicosido en el intervalo de pH 1 a 7.

Fuente: (L. ZAPATA, 2014).

- **Efecto de la temperatura**

Incrementos de temperatura resultan en pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras (Timberlake, 1980).

Por lo tanto las antocianinas altamente hidroxiladas son menos estables térmicamente que las metiladas, glicosidadas o acetiladas (Fennema, 2000). Incrementos de temperatura provocan pérdidas del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo, con la consecuente producción de chalconas incoloras (GARZÓN, 2008a).

- **Efecto del Agua**

El agua puede actuar como nucleófilo y atacar el cation flavilio en C-2 formando la base carbinol incolora según el mecanismo explicado anteriormente, sin embargo, esta degradación puede variar, dependiendo de la concentración de azúcares.



Cuando los azúcares se encuentran a altas concentraciones, la actividad de agua es baja, por lo que las moléculas de agua tienen menores posibilidades de atacar el catión flavilio para formar la base carbinol.

Sin embargo, cuando los azúcares están en bajas concentraciones la actividad de agua no se ve afectada, por lo que sus productos de degradación (hidroximetilfurfural y furfural) aceleran la degradación de las antocianinas (Kopjar, Piližota, Šubarić, & Babić, 2009), (L. ZAPATA, 2014), (Lewis, Walker, & Lancaster, 1995).

- **Efecto del oxígeno**

Las antocianinas pueden oxidarse por reacción directa con oxígeno, o bien a través de una oxidación indirecta con compuestos que han sido previamente oxidados, dando lugar a la formación de productos de color marrón o incoloro. También, pueden reaccionar con radicales de oxígeno actuando como antioxidantes.

Estos mecanismos de oxidación se ven favorecidos cuando se eleva la temperatura (Rein, 2005b).

- **Efecto de la luz**

La luz es esencial para la biosíntesis de las antocianinas, pero también acelera la degradación de antocianinas (Markakis, 1982). Preservan mejor su color cuando se mantienen en la oscuridad. La pérdida más vigorosa de antocianina (70%) se observó bajo luz fluorescente con ligera temperatura elevada de almacenamiento.

### **1.2.8.3. Extracción de antocianinas.**

Las antocianinas se pueden extraer de diferentes tejidos vegetales (Kechinski, Guimarães, Noreña, Tessaro, & Marczak, 2010). A nivel comercial, las antocianinas se obtienen principalmente de los subproductos industriales de la uva.

En la actualidad existe la tendencia de utilizar los extractos antociánicos sin necesidad de realizar la separación de los distintos componentes, debido a que todos ellos, presentan propiedades antioxidantes.

El método usual de obtención es la extracción sólido-líquido. El carácter polar de la molécula de antocianina permite su solubilidad en variados solventes, tales como alcoholes, acetona o agua. Ya que su estabilidad es afectada fácilmente por modificaciones estructurales con grupos hidroxilo, metoxilo, glucósidos y grupos acilos, además de factores como la temperatura y la luz el método de extracción debe ser el más adecuado para cada aplicación concreta. Las condiciones de extracción, tales como relación sólido-líquido, temperatura, tiempo, tipo de disolvente y concentración de disolvente influyen en la estabilidad de las antocianinas, así como también en la concentración de antocianinas extraídas. Así, se debe maximizar la recuperación de pigmentos, minimizar los compuestos adjuntos extraídos y limitar la degradación o alteración del estado natural del extracto.

Las antocianinas son moléculas polares y consecuentemente son más solubles en solventes polares que en no polares. A valores de pH donde las moléculas de antocianinas están no ionizadas, pueden ser solubles en éter y no son estables en soluciones neutras y alcalinas; por tanto, los métodos convencionales empleados para la extracción de antocianinas implica el uso de solventes ácidos (Daniel) (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Métodos de extracción de antocianinas.

Método	Características
0.001 % HCl en metanol	Este es el método más efectivo, pero el HCl es corrosivo y el metanol tiene efectos tóxicos en la salud humana.
0.001 % HCl en etanol	80% tan efectivo como el metanol.
0.001 % HCl en agua	27 % tan efectivo como el metanol.
Metanol acidificado con ácido cítrico	Este es el más eficiente de los ácidos orgánicos.
Agua acidificada con ácido acético	En eficiencia es seguido por el ácido cítrico, tartárico y clorhídrico.
Agua con 1000 ppm de SO <sub>2</sub>	La extracción es mejor que la obtenida por el uso de la extracción tradicional los cuales implica sistemas de etanol: ácido acético: agua.

Fuente: (Delgado-Vargas, Jiménez, & Paredes-López, 2000)

### **Espectros UV-visible de antocianinas**

Debido a su estructura, las antocianinas presentan dos máximos de absorción tanto en la región visible como en la ultravioleta la primera entre 465 y 550 nm y la segunda más

pequeña en el UV alrededor de 275nm (J. B. Harborne & Williams, 1998). Es así como se pueden identificar las antocianinas por sus espectros de absorción (Andersen & Francis, 2004).

Debido a la gran variedad de estructuras moleculares de las antocianinas que pueden estar presentes en un mismo material y sus bandas de absorción en posiciones muy cercanas, las separaciones y determinaciones por espectrometría se realizan determinando la concentración total de las antocianinas, refiriendo la concentración respecto a un compuesto en particular. Esto permite conocer con seguridad la cantidad total de antocianinas en el material de análisis. A continuación se describen diferentes métodos de espectroscopia UV- Visible, en materiales vegetales (frutos, jugos y vinos de frutos respectivamente) reportados en la literatura (Guerra & Ortega, 2006) para las antocianinas (Tabla 4).

La glicosidación conlleva a un desplazamiento hipsocrómico de los máximos de absorción en el visible. Así por ejemplo, entre la pelargonidina ( $\lambda_{\max}$  520nm) y la pelargonidina-3-glucósido (505nm), ocurre un desplazamiento de  $\Delta\lambda$  de 15 nm; entre cianidina ( $\lambda_{\max}$  535nm) y cianidina-3-glucósido ( $\lambda_{\max}$  523nm) un  $\Delta\lambda$  de 12 nm, entre delfinidina ( $\lambda_{\max}$  544) y delfinidina-3-glucósido ( $\lambda_{\max}$  534nm) un  $\Delta\lambda$  de 10 nm (J. B. Harborne & Williams, 2001).

**Tabla 4. Bandas de absorción de las antocianinas más comunes**

Compuesto	Banda de absorción (nm)	Coefficiente de extinción ( $\epsilon$ )	Solvente
Pelargonidina	530	32000	HCl-etanol
Pelargonidina 3 - glucósido	515	13000	HCl-etanol
Pelargonidina 3-5 glucósido	505	-	HCl-metanol
Peonidina	---	-	-
Cianidina	535	-	HCl-metanol
Cianidina 3-glucósido	525	29600	HCl-metanol
Cianidina 3-ramnoglucósido	532	-	HCl-etanol
Cianidina 3,5-diglucósido	522	-	HCl-metanol
Mecocianina	523	-	HCl-metanol
Delfinidina	544	-	HCl-metanol
Delfinidina 3-glucósido	535	-	HCl-metanol
Delfinidina 3,5-diglucósido	534	-	HCl-metanol
Malvidina 3-glucósido	535	29500	-
Malvidina 3,5-diglucósido	520	37700	-
Petunidina 3,5-diglucósido	540	-	HCl-metanol

Fuente: (Guerra & Ortega, 2006).

Los derivados acilados no muestran diferencia con respecto a los correspondientes no acilados en la zona del visible, sin embargo, en la región del ultravioleta suelen presentar un máximo adicional en el intervalo de  $\lambda_{\max} = 310-335$  nm, correspondiente a la absorción del grupo acilo como en la figura 9; la esterificación con ácido *p*-cumárico aumenta la absorción en torno a 308-313 nm y con ácido caféico en  $\lambda_{\max}$  326-329 nm. Este hombro no se presenta cuando el ácido sustituyente es el ácido acético (Wrolstad & Heatherbell, 1974).

En el caso de los fenoles de tipo flavonoides se presentan 2 bandas de absorción características: la banda del anillo aromático A con un máximo de absorción en el rango 240-285 nm (banda benzoilo) y otra banda del anillo B con máximo de absorción en el rango 300-550 nm (banda cinamoilo) (Merken & Beecher, 2000), (Martínez-Cruz et al., 2011), (Bedascarrasbure, Maldonado, Fierro Morales, & Álvarez, 2006).

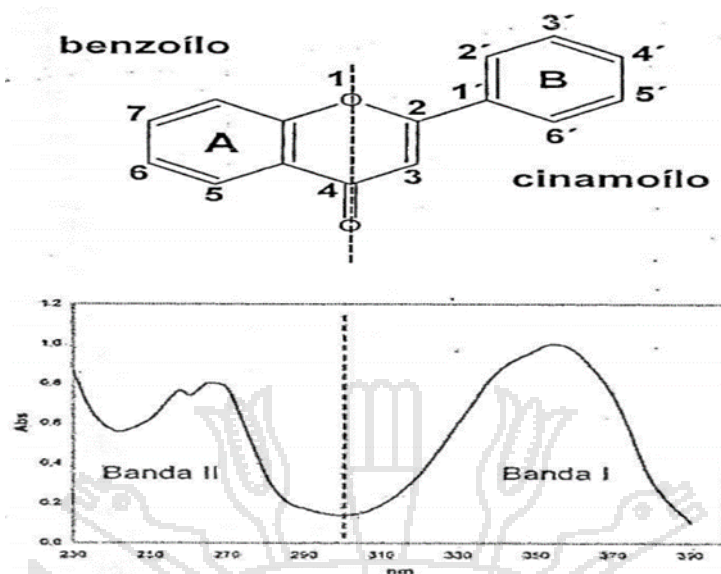


Figura 11. Bandas de absorción UV de flavonoides  
Fuente: (Bedascarrasbure et al., 2006).

La posición de estas bandas permite distinguir entre los distintos tipos de flavonoides tal como se puede explicar en el trabajo de investigación "Flavonoides aislados de propóleos chilenos y bioactividad" citado por (Bedascarrasbure et al., 2006) de la figura 11.

En el caso de las flavonas, presentan máximos entre 304 - 350 nm (banda I) y 240-270 nm (banda II). Las flavanonas presentan máximos entre 270-290 (banda II) y entre 300-330 nm (banda I) de menor intensidad. Los flavonoles, presentan máximos entre 340-390 (banda I) y 240-270 nm (banda II). Las isoflavonas, tienen máximos entre 250-270 nm (banda II) y un máximo de menor intensidad a los 330 nm (banda I). Las auronas, se caracterizan por presentar tres o cuatro máximos, teniendo su principal absorción entre 350-430 nm. Las chalconas, presentan una banda de baja intensidad entre 220-270 nm y absorben fuertemente entre 300-340 nm. Las antocianinas producen una banda entre 500-550 nm además de otras de menor intensidad entre 430-440 nm y 270-280 nm (Figura 14), los cuales pueden variar con el pH y solvente utilizado (Paredes).

En la tabla 5, se dan los rangos de los valores de absorción para las bandas I y II de los diferentes tipos de flavonoides y en las figuras 12 y 13 que a continuación se observan se presentan los espectros UV-Vis característicos (de Ugaz, 1994).

**Tabla 5.** Valores de absorción para las BI y BII de los diferentes tipos de flavonoides

<i>Banda II, nm</i>	<i>Banda I, nm</i>	<i>Tipo de flavonoide</i>
250-280	310-350	flavonas
250-280	330-360	flavonoles (3-OH substituido)
250-280	350-385	flavonoles (3-OH libre)
245-275	310-330h	isoflavonas (5-deoxi-6,7-dioxi)
275-295	300-330h	isoflavonas, dihidroflavonoles
230-270 (baja intensidad)	340-390	chalconas
230-270 (baja intensidad)	380-430	auronas
270-280	465-560	antocianidinas, <b>antocianinas</b>

Fuente: (de Ugaz, 1994).



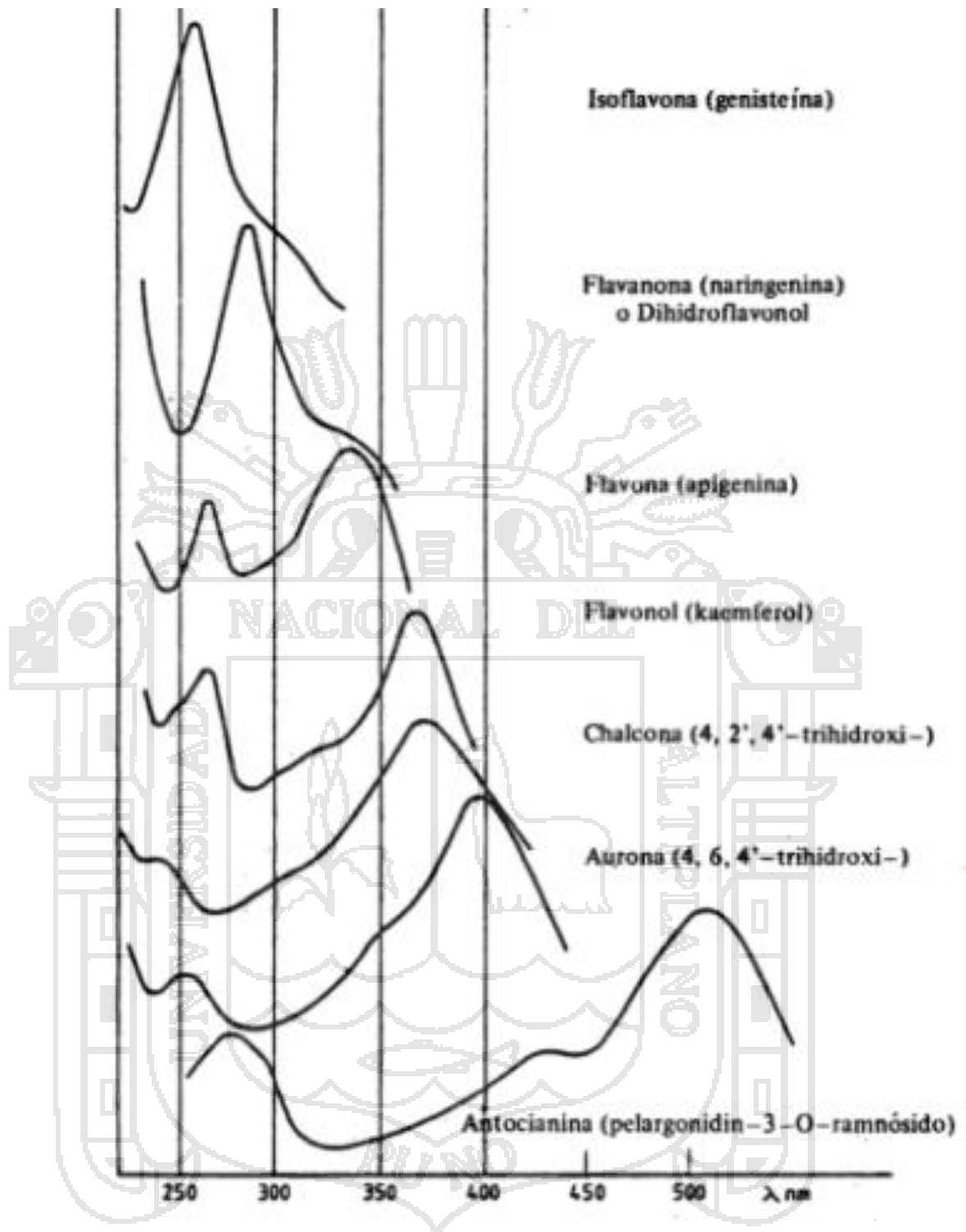


Figura 12. Espectros de absorción UV-Vis de diferentes tipos de flavonoides con modelos de hidroxilación equivalentes  
Fuente: (de Ugaz, 1994).

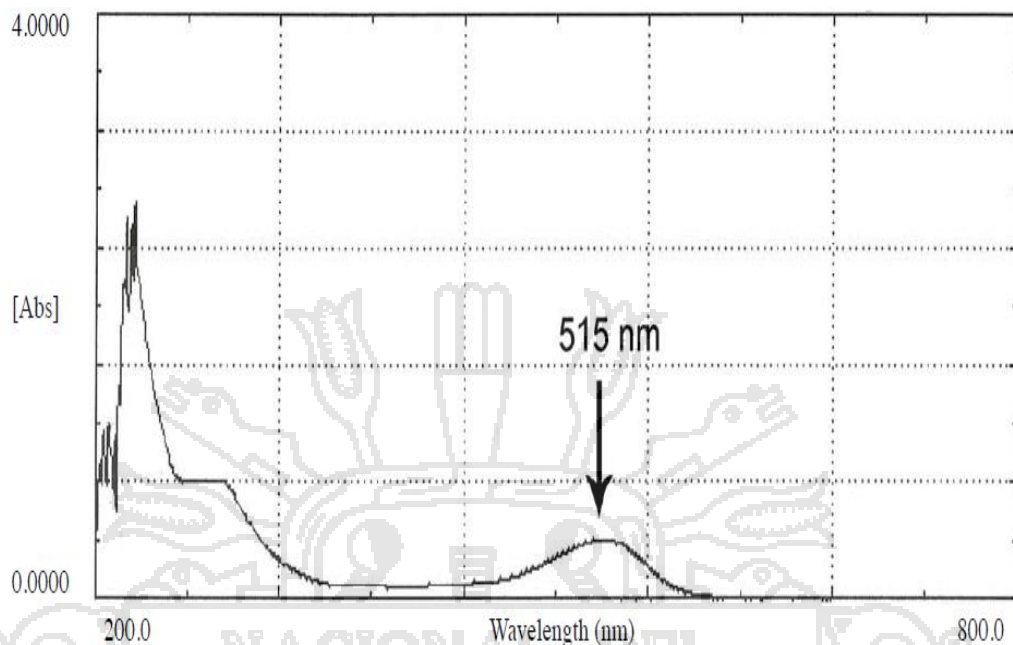


Figura 13. Espectro ultravioleta-visible de extracto metanólico de *R. adenotrichus*. Se observa la banda de absorción a 515 nm característica para antocianinas

Fuente: (Martínez-Cruz et al., 2011).

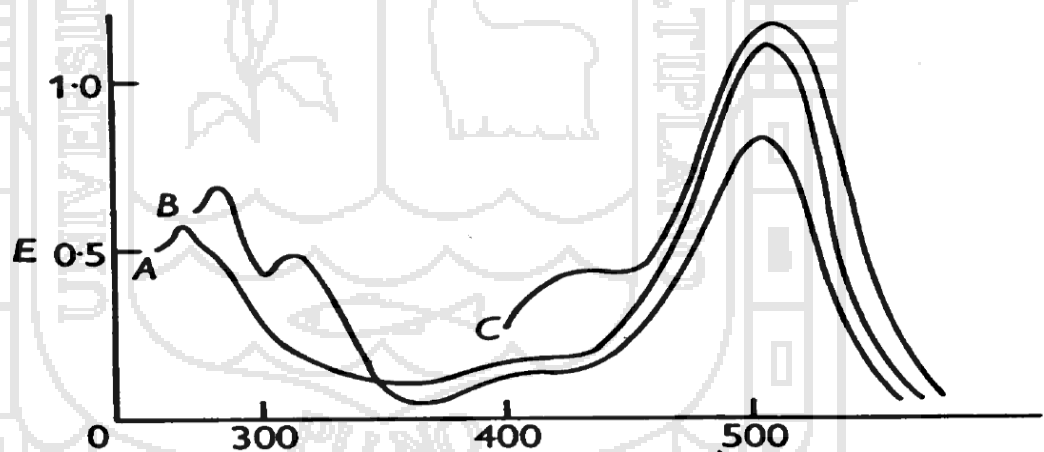


Figura 14. Espectro de absorción: curva A, pelargonidina 3:5 - diglucósido; Curva B, pelargonidina diglucósido 3:5 Acilado con ácido p-cumárico; Curva C, Pelargonidina 3 - monoglucósido. Las concentraciones de Los pigmentos eran de aproximadamente 50  $\mu$ M, en solución metanólica 0-01% (p/v) HCl

Fuente: (J. Harborne, 1958).



#### 1.2.8.4. Espectroscopia FTIR de antocianinas.

La espectroscopia vibracional fue una de las primeras técnicas espectroscópicas que encontró un uso extendido. La región IR del espectro electromagnético se encuentra entre  $12800 - 10 \text{ cm}^{-1}$ . Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los equipos se puede dividir en tres zonas: IR cercano (NIR):  $12800 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ , IR medio:  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ; IR lejano:  $400 - 10 \text{ cm}^{-1}$ , siendo en el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales. El NIR requiere una mínima o nula preparación de la muestra y ofrece un análisis cuantitativo sin consumir o destruir la muestra.

Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de la instrumentación, es conveniente dividir el espectro infrarrojo en tres regiones denominadas: Infrarrojo cercano, medio y lejano. En la tabla 6 se muestran los límites aproximados de cada una de ellas.

**Tabla 6.** Regiones del espectro infrarrojo

Región	Intervalo de longitud de onda ( $\lambda$ ), $\mu\text{m}$	Intervalo de número de onda ( $\bar{\nu}$ ), $\text{cm}^{-1}$	Intervalo de frecuencias ( $\nu$ ), Hz
Cercano	0,78 a 2,5	12.800 a 4.000	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
Medio	2,5 a 50	4.000 a 200	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
Lejano	50 a 1.000	200 a 10	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$
La más utilizada	2,5 a 15	4.000 a 670	$1,2 \times 10^{14}$ a $2,0 \times 10^{13}$

Fuente: (Douglas Arvid Skoog, Holler, & Timothy, 2001).

La espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR), ha mejorado la calidad de los espectros y minimizado el tiempo requerido para la obtención de datos.

Una de las grandes ventajas de la espectroscopia FTIR es su versatilidad, ya que permite estudiar prácticamente cualquier muestra con independencia del estado en que se encuentre: líquidos, disoluciones, pastas, polvos, fibras, films, gases o superficies son algunos ejemplos.

Como primera aproximación, un espectro IR se obtiene al pasar radiación a través de una muestra y determinar que fracción de esta radiación incidente ha sido absorbida. La energía particular a la que aparece cada pico en un espectro guarda relación con la frecuencia de vibración de una parte de la molécula.

El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de ésta molécula. Así, entre otras aplicaciones, el espectro IR se puede usar como “huella dactilar” en la identificación y cuantificación de muestras desconocidas mediante la comparación con espectros de referencia y patrones respectivamente (E Marta Kuskoski et al., 2004).

#### **Reflectancia total atenuada (ATR)**

Una manera común de obtener el espectro FTIR de una muestra es poner una pequeña cantidad en contacto con un material transparente, cristalino a través del cual un haz de radiación infrarroja pasa. El haz rebota en el interior del diamante, el proceso se conoce como reflexión interna total, que es también el responsable del paso de la luz por la fibra óptica. Mientras los haces son reflectados dentro del diamante, penetran cerca de 1 micra en la muestra, por virtud de un efecto llamado reflectancia total atenuada. La técnica de FTIR es tan sensible que incluso esta distancia es suficiente para obtener un espectro infrarrojo y requiere poca o ninguna preparación para la mayoría de las muestras y es una de las técnicas de muestreo más versátiles (FLAX, 2006).

### Análisis espectrométricos

Los espectros de estos análisis nos brindan una información sobre su posible composición y asumir la ausencia o presencia de un determinado grupo funcional que obedece a frecuencias de vibración ( $\text{cm}^{-1}$ ) como en la tabla 7.



**Tabla 7.** Frecuencias de absorción características del infrarrojo

	<b>Banda</b>	<b>(cm<sup>-1</sup>)</b>		<b>Banda</b>	<b>(cm<sup>-1</sup>)</b>
Alcoholes	O-H (t)	~3650(v) ó 3400-3300 (i,a)	Alcanos	C-H (t)	2950-2800 (f)
	C-O (t)	1260-1000 (i)		CH <sub>2</sub> (f)	~1465
Éteres	C-O-C (t) (dialquil)	1300-1000(i)		CH <sub>3</sub> (f)	~1375
	C-O-C (t) (diaril)	~1250 y ~1120		CH <sub>2</sub> (f) (4 ó más)	~720
Aldehídos	C-H (t) (aldehído)	~2850 y ~2750 (m)	Alquenos	=CH (t)	3100-3010
	C=O (t)	~1725(i)		C=C (t) (aislado)	1690-1630
Cetonas	C=O (t)	~1715(i)		C=C (t) (conjugado)	1640-1610
	C-C (t)	1300-1100		C-H (f) (en el plano)	1430-1290
Ácidos carboxílicos	O-H (t)	3400-2400(i,a)		C-H (f) (monosustituído)	~990 y ~910
	C=O (t)	1730-1700(i)		C-H (f) (disustituído - E)	~970
	C-O (t)	1320-1210(i)		C-H (f) (disustituído - 1,1)	~890
	O-H (f)	1440-1400		C-H (f) (disustituído - Z)	~700
Ésteres	C=O (t)	1750-1735(i)		C-H (f) (trisustituído)	~815
	C-C(O)-O (t) (acetatos)	1260-1230(i)		C-H (t) (acetilénico)	~3300(v)
	C-C(O)-O (t) (el resto)	1210-1160(i)	Alquinos	CC (t) (triple enlace)	~2150(d)
Cloruros de ácidos	C=O (t)	1810-1775(i)		C-H (f) (acetilénico)	650-600
	C-Cl (t)	730-550	Aromáticos	C-H (t)	3020-3000
Anhídridos	C=O (t)	1830-1800 y 1775-1740(i)		C=C (t)	~1600 y ~1475
	C-O (t)	1300-900(i)		C-H (f) (mono)	770-730 y 715-685
Aminas	N-H (t)	3500-3300(m)		C-H (f) (orto)	770-735
	N-H (f)	1640-1500		C-H (f) (meta)	~880 y ~780 y ~690
	C-N (t) (alquil)	1200-1025(d)		C-H (f) (para)	850-800
	C-N (t) (aril)	1360-1250(i)			
	N-H (f)	~800			
Amidas	N-H (t)	3500-3180(m)			
	C=O (t)	1680-1630 (i)			

Fuente: (Wade, Pedrero, & García, 2004),(Pavia, Lampman, Kriz, & Vyvyan, 2008)

Abreviaturas

a = ancha

d = débil

f =vibración de flexión

i = intensa

m = media

t = vibración de tensión;

v = variable

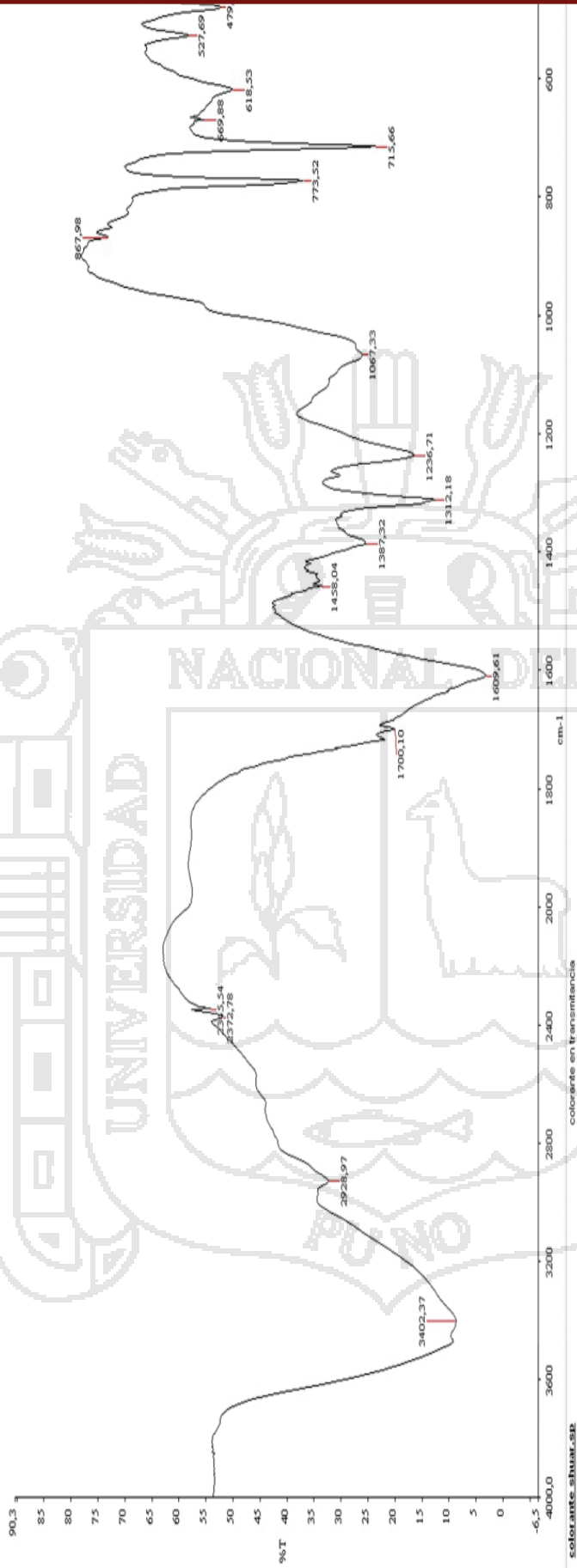


Figura 15. Espectro infrarrojo de la fracción de un colorante flavínico  
 Fuente: (Noriega Rivera, Coba Santamaría, Naikiyai, & Abad, 2011), (Bellatin, Herrera, Navarro, Sun-Kou, & Llanos, 2014)

En el espectro Infrarrojo (Pavia et al., 2008), (Torres et al., 2015), (Aguilar-López et al., 2012), la presencia de antocianinas puede ser interpretada de la siguiente manera como en la figura 15.

Tensión O-H: Banda ancha desde 3500 a 3200  $\text{cm}^{-1}$ . En ausencia de puentes de hidrógeno aparece como un pico agudo a 3650-3600  $\text{cm}^{-1}$ .

- El estiramiento C-H se produce aproximadamente de 2900 a 3000  $\text{cm}^{-1}$ . A medida que el átomo unido al carbono aumenta en masa, la frecuencia de vibración disminuye (los números de onda se hacen más pequeños).
- Grupos carbonílicos C = O por las señales a 1850 – 1650  $\text{cm}^{-1}$ , insaturaciones o anillos aromáticos por las señales entre 1670–1500  $\text{cm}^{-1}$ .
- Estiramiento C=C anillo aromático a 1600 - 1475  $\text{cm}^{-1}$ .
- Tensión C-O: Banda comprendida entre 1250-1000  $\text{cm}^{-1}$ . Permite distinguir entre alcoholes primarios (1050  $\text{cm}^{-1}$ ), secundarios (1100  $\text{cm}^{-1}$ ), terciarios (1150  $\text{cm}^{-1}$ ) y fenoles (1220  $\text{cm}^{-1}$ ).
- Se asocia a la vibración de tensión -C-O-C- entre 1120 y 1250  $\text{cm}^{-1}$ .
- 1050  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye a la deformación en el plano aromático = C-H (benceno).

Todas estas características de frecuencias de vibración sugieren una estructura similar a un flavonoide del tipo antocianina.

#### 1.2.8.5. Separación e identificación de antocianinas por HPLC

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar (columna) y una fase móvil. La fase estacionaria es sílica que se ha tratado con  $\text{RMe}_2\text{SiCl}$

La fase móvil actúa de portador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra. La utilización de los diferentes detectores dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar. Concluido el procedimiento se emite un cromatograma indicando los tiempos definidos para cada componente en forma secuencial, indicando sus unidades de absorbancia respectiva formando picos (Dabrio, Blanch, & Matas, 1999), (Douglas A Skoog, Holler, Nieman, & Gómez, 2001).

Para la separación y cuantificación de antocianinas, la técnica más empleada hoy en día es la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) puesto que esta permite la separación simultánea, la identificación y la cuantificación de los compuestos de antocianinas sin requerir pureza excesiva de los extractos (Escribano-Bailón, Santos-Buelga, & Rivas-Gonzalo, 2004), un ejemplo es la determinación de las principales antocianidinas en vinos por HPLC (Marx, Holbach, & Otteneder, 2000). Las columnas (diámetro interno 4.6 mm y largo 100-300 mm) son usualmente mantenidas a temperatura ambiente, y los sistemas de elusión son binarios, usando solventes acidificados acuosos tales como ácido acético, ácido perclórico o ácido fórmico en un solvente orgánico tal como metanol o acetonitrilo. Las antocianinas separadas son detectadas y cuantificadas a 525 nm; su identificación está basada en los tiempos de retención correspondientes y espectros ultravioleta-visibles (UV-Vis) comparado con la de los estándares auténticos puros tales como delfinidina-3-glucósido, delfinidina-3-rutinósido, cianidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, cianidina-3-rutinósido, peonidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido y cloruro de cianidina que están comercialmente disponibles.

El contenido total de antocianinas es calculado en  $\mu\text{g/g}$  usando una curva estándar para cianidina-3-glucósido o delfinidina-3-glucósido.

Los espectros de absorción UV-Vis de una antocianina pueden proveer información sobre la naturaleza de la antocianidina, modelo de glucosilación y posiblemente de acilación (da Costa, Horton, & Margolis, 2000), (Aguilera-Otíz et al., 2011).

Figuras 16 y 17 se presentan cromatogramas tipo de un perfil antociánico, obtenido por cromatografía líquida de alta resolución, en vino cv. Carménère. Los compuestos antociánicos (Hernández Domínguez, 2012) fueron identificados de acuerdo a su espectro UV y tiempo de retención (min).





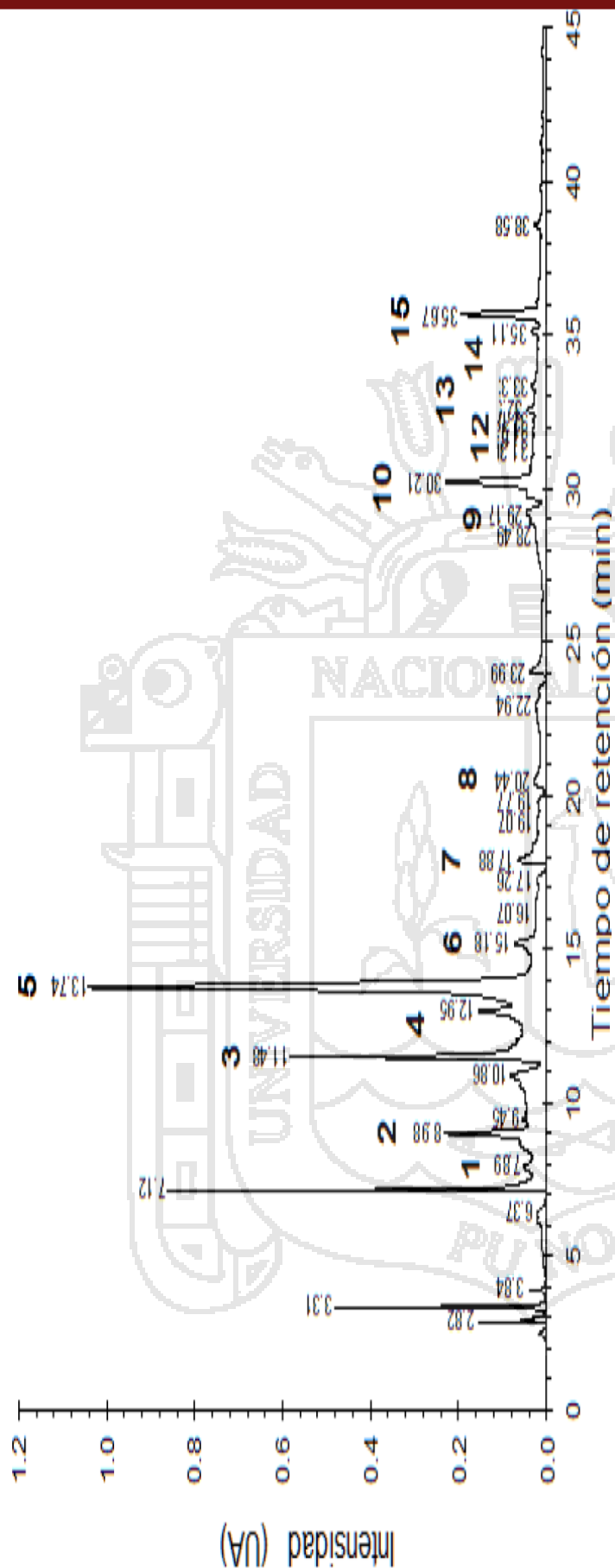
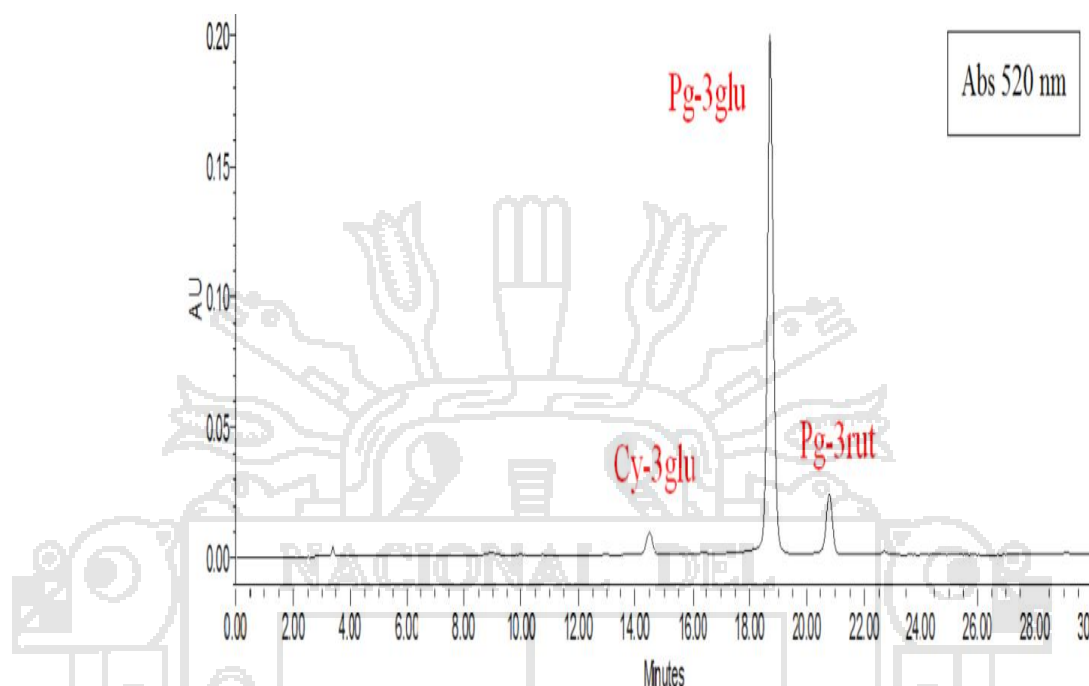


Figura 16. Cromatograma típico de Antocianinas de un vino cv. Carménère (520 nm)

1. delfinidina-3-glucósido, 2. cianidina-3-glucósido, 3. petunidina-3-glucósido, 4. peonidina-3-glucósido, 5. malvidina-3-glucósido, 6. delfinidina-3-acetil-glucósido, 7. cianidina-3-acetil-glucósido, 8. petunidina-3-acetil-glucósido, 9. peonidina-3-acetilglucósido, 10. malvidina-3-acetil-glucósido, 11. delfinidina-*p*-cumaril-glucósido, 12. cianidina-*p*-cumaril-glucósido, 13. petunidina-*p*-cumaril-glucósido, 14. peonidina-*p*-cumaril-glucósido, 15. malvidina-*p*-cumaril-glucósido. Fuente: (Hernández Domínguez, 2012)

En la siguiente figura se presenta el cromatograma general de la fresa obtenida con el detector de fotiodos (PDA) y el perfil de los antocianos obtenidos a una absorbancia de 520 nm.



*Figura 17.* Cromatograma general y perfil de antocianos a 520 nm de la fresa

Fuente: (Díaz García, 2012) .

Trabajo de investigación denominado Capacidad antioxidante y caracterización estructural de las antocianinas de los frutos rojos entre ellos *Vitis vinifera L. cv" red globe"* habiendo corrido cromatografía HPLC en los extractos de cascara de uva antes indicada, ha identificado que el orden de tiempos de retención del cromatograma tienen el siguiente orden(Márquez Mendoza, 2011):

Grupo I:

Delfinidina-3-glucósido,  
Cianidina-3- glucósido,  
Petunidina-3-glucósido,  
Peonidina-3-glucósido,  
Malvidina-3-glucósido.

Grupo II:

Peonidin-3-acetil glucósido  
Malvidin-3-acetil glucósido

Grupo III:

Peonidin-3-cumaril glucósido  
Malvidin-3-cumaril glucósido

Tal como se cita en otras investigaciones similares como “Caracterización varietal de vinos por HPLC” (Gutiérrez, García-Romero, & de Calatrava, 2004), (Eder, Wendelin, & Barna, 1994), además se observa sus espectros UV-Vis a 520 nm como en la Figura 18.

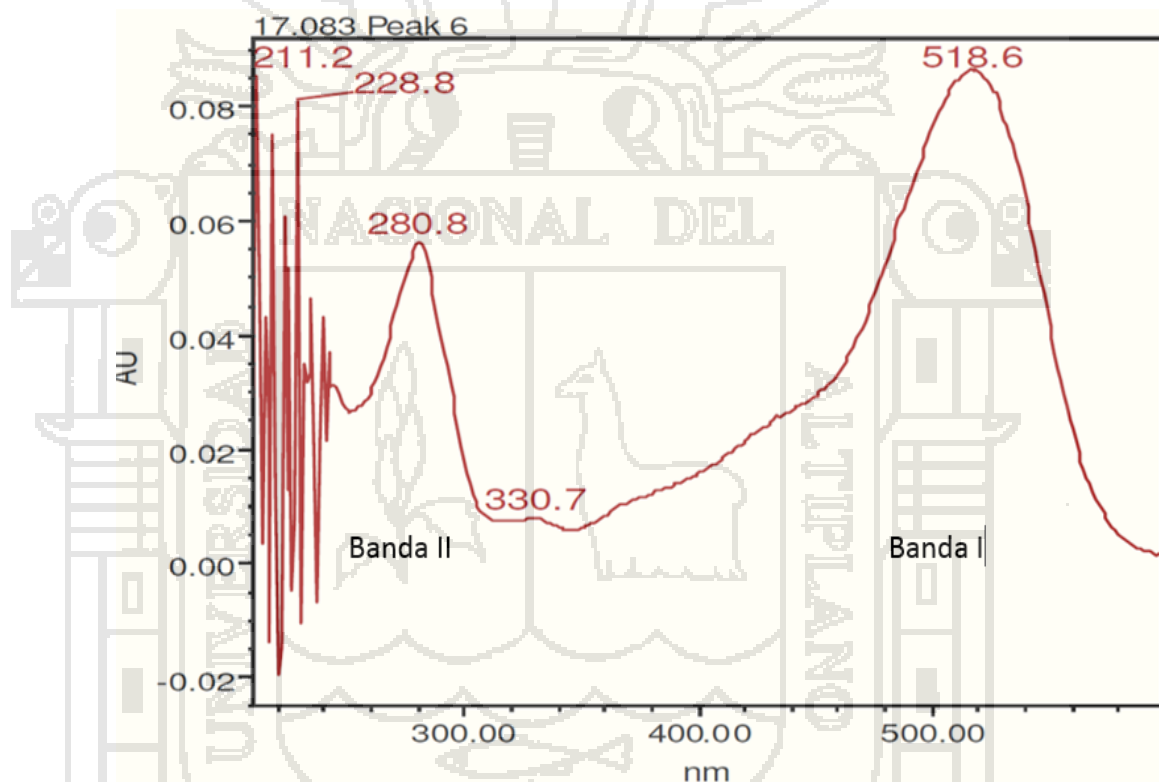


Figura 18. Barrido UV-Vis a 520 nm del cromatograma de *Vitisvinifera* L. c.v. “Red Globe” correspondiente a Cianidina 3-glucósido  
Fuente: (Márquez Mendoza, 2011).

## 1.2.9. Análisis de antioxidantes en compuestos fenólicos

### 1.2.9.1. Determinación del contenido de antocianinas totales por el método pH diferencial

No solamente se usa la cuantificación de antocianinas por cromatografía HPLC con UV-Vis o detectores de matriz fotodiodos (PDA) usando para cuantificarlos patrones externos, también se puede cuantificar por el Método de pH diferencial como se indicó antes. Los pigmentos de antocianina experimentan transformaciones estructurales reversibles con un cambio en el pH, observable en los espectros de absorbancia UV-Vis que son sorprendentemente diferentes. La forma de oxonium coloreada predomina a pH 1,0 y la forma hemiacetal incolora a pH 4.5 (Figura 19 y 20).

Este método se basa en este cambio y permite una medición precisa y rápida de las antocianinas totales, incluso en presencia de polimerizados, pigmentos degradados y otros compuestos interferentes (Giusti & Wrolstad, 2001).

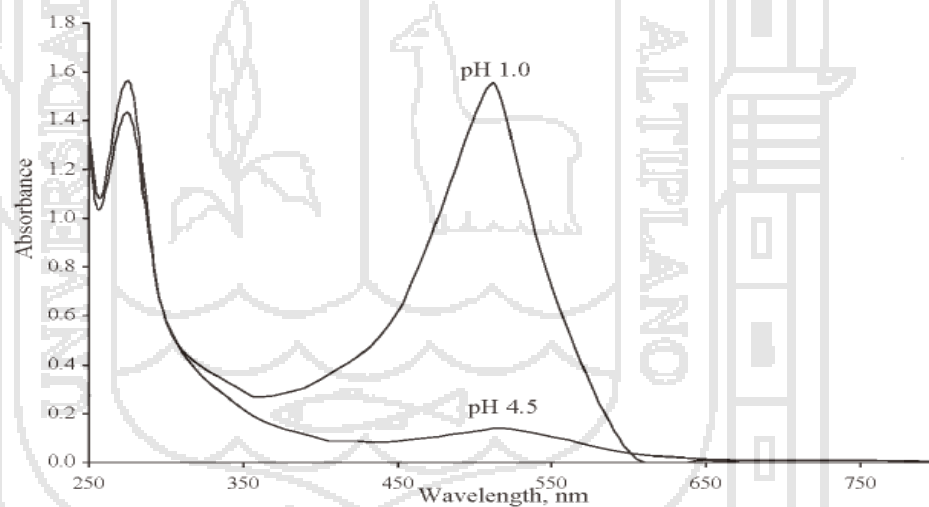


Figura 19. Características espectrales de la antocianina de arándanos en tampones a pH 1.0 y 4.5

Fuente: (Lee, Durst, & Wrolstad, 2005).

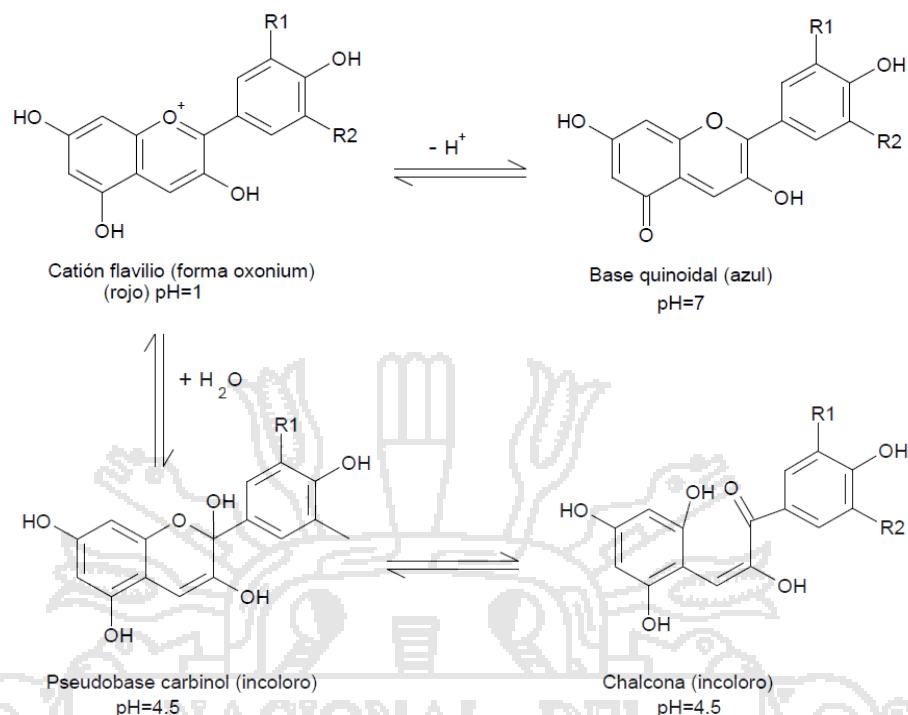


Figura 20. Estructura de antocianinas a diferentes valores de pH

Fuente: (Giusti & Wrolstad, 2001).

### 1.2.9.2. Determinación de polifenoles totales por el método Folin – Ciocalteu

El ensayo Folin - Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin - Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que se mide para evaluar el contenido en polifenoles (V. Singleton & Rossi, 1965).

La reacción redox (Figura 21) conlleva a la desprotonación de los compuestos fenólicos (en el ejemplo, patrón de ácido gálico) en un medio básico, mediante la generación de anión fenolato. Después de ello, hay una reacción redox entre el anión fenolato y el Folin - Ciocalteu en el que el molibdeno (V. L. Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1999), el componente reactivo de Folin – Ciocalteu se somete a reducción y el medio de reacción cambia de color amarillo a azul.

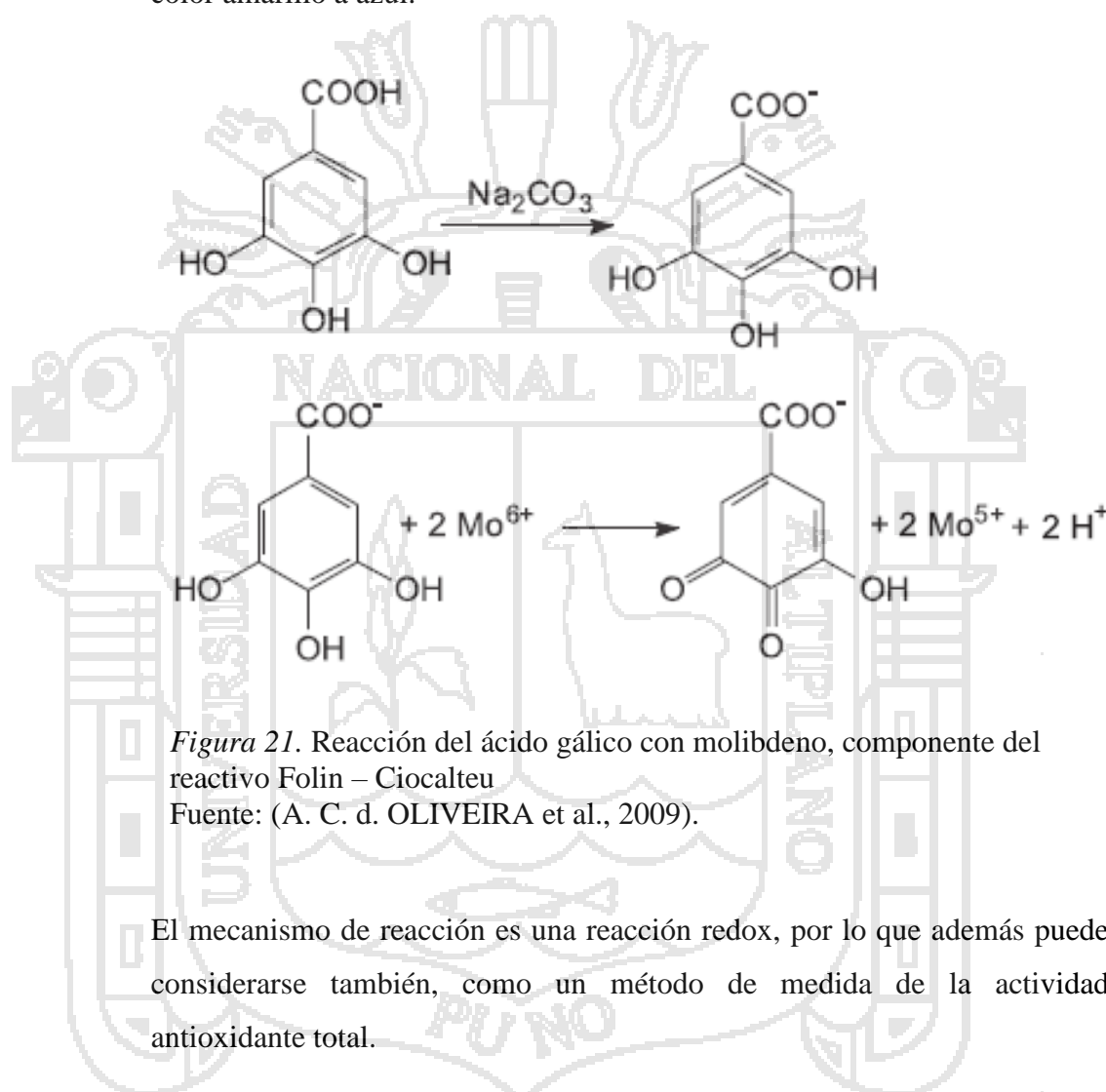


Figura 21. Reacción del ácido gálico con molibdeno, componente del reactivo Folin – Ciocalteu  
Fuente: (A. C. d. OLIVEIRA et al., 2009).

El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total.

La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría UV - Visible en base a una recta patrón de ácido gálico (E. G. Martínez, Segovia, & López, 2015).

### 1.2.9.3. Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS

Esta determinación de la capacidad antioxidante por el Método ABTS del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico) consiste en una técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes (Miller, Rice-Evans, Davies, Gopinathan, & Milner, 1993), (Re et al., 1999). Inicialmente el ABTS es oxidado por medio del persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) para formar el catión radical ABTS $\bullet+$  (verde – azul) que es cuantificable a 734 nm. El ABTS $\bullet+$  es un catión radical estable debido a su capacidad de deslocalizar el electrón desapareado entre los átomos de nitrógeno de su estructura. De esta manera, el ABTS $\bullet+$  puede reaccionar con los compuestos polifenólicos (se emplea el Trolox como compuesto de referencia), ocasionando la formación del ABTS (incolore) y la oxidación del compuesto polifenólico. Los resultados de los compuestos a analizar se expresan en relación con equivalentes de Trolox (Ácido 6 - hidroxil - 2,5,7,8 - tetrametilcroman - 2 - carboxílico) utilizado como reactivo de calibración y es aplicable tanto a sistemas acuosos y lipofílicos (Vasco, Ruales, & Kamal-Eldin, 2008).

La reacción en la que se basa este ensayo puede resumirse como sigue (Amaya Rodríguez & Portillo Membreño, 2013):



$$\lambda_{max} = 734 \text{ nm}$$



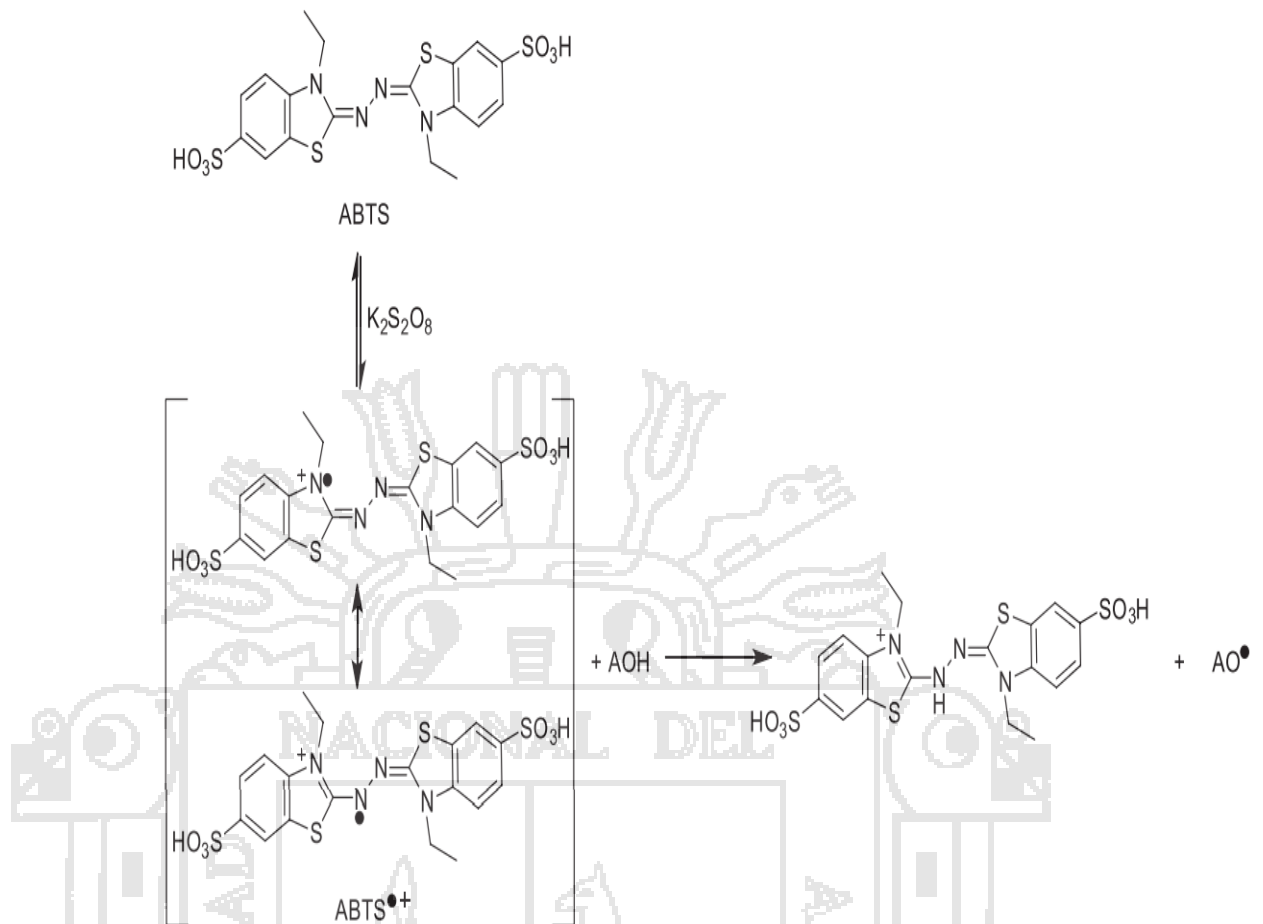


Figura 22. Oxidación de ABTS por persulfato potásico para generar catión radical ABTS  $\bullet+$  y su reacción con un compuesto antiradical (AOH)  
Fuente: (S. d. Oliveira et al., 2014).

Pese a que otras longitudes de onda tales como 415nm y 645 nm se han usado en el ensayo ABTS/TEAC, el pico a la longitud de onda de 734 nm ha sido preferido debido a la menor interferencia de otros pigmentos de las plantas (Fernández Pinto, 2011).

Entre mayor es la actividad antioxidante del polifenol, mayor es la decoloración generada sobre el  $ABTS^{\bullet+}$  debido a que se cuantifica la decoloración del cromóforo  $ABTS^{\bullet+}$  ocasionada por el proceso de reducción.



Los compuestos polifenólicos son buenos compuestos antioxidantes debido a la capacidad que tienen de estabilizar la carga generada sobre el polifenol y la posterior formación de la quinona, ocasionando la completa neutralización de la carga generada tras el proceso de oxidación. De esta manera, el método ABTS permite la cuantificación de la actividad antioxidante de carácter principalmente hidrofílico (antioxidantes solubles en agua), (Ver figura 22) aunque el método también puede ser extrapolado a antioxidantes lipofílicos como los carotenoides (Osman, Wong, & Fernyhough, 2006), (Guerrero Cáceres, 2012).

La oxidación con persulfato potásico se lleva a cabo a temperatura ambiente, en ausencia de luz, de 12 a 16 h. El persulfato potásico y el ABTS reaccionan estequiométricamente (1:0.5). Una vez generado el radical la medida se realiza mediante un ensayo de post-adición. La generación del radical catiónico ABTS constituye la base de uno de los métodos espectrofotométricos que se han aplicado a la medición de la actividad antioxidante total de soluciones de sustancias puras, mezclas acuosas y bebidas.

### 1.3. Antecedentes

Hay investigaciones en bayas o frutos comestibles de pulpa pequeña y blanda de moras, frambuesas negras, arándanos, frambuesas rojas y fresas, pueden tener efectos beneficiosos contra varios tipos de cáncer humano. El potencial anticancerígeno de los frutos está relacionado, al menos en parte, con una multitud de fitoquímicos bioactivos que contienen estas coloridas frutas, incluidos los polifenoles (flavonoides, proantocianidinas, elagitaninos, galotaninos, ácidos fenólicos), estilbenoides, lignanos y triterpenoides. Los fitoquímicos de los frutos también pueden potencialmente sensibilizar las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos al inhibir las vías que conducen a la resistencia al tratamiento, y el consumo de frutos puede proporcionar protección contra las toxicidades asociadas a la terapia (Seeram, 2008a).

Han estudiado cinco especies vegetales de amplia distribución y uso medicinal tradicional en la comunidad de Carmen Pampa Coroico Bolivia, los mismos que son el *Rubus boliviensis* (khari-khari), *Castilleja arvensis* (vira-vira), *Baccharis genistelloides ssp crispa* (charara), *Liabum hastifolium* (toco-toco) y *Acmella ciliata* (laili-laili), que fueron sometidas a un estudio fitoquímico y espectroscópico preliminar con el objetivo de seleccionar especies vegetales promisorias para estudios más profundos. En el estudio fitoquímico preliminar se pudo determinar que las especies tienen, principalmente, compuestos fenólicos, taninos, triterpenos o esteroides. Adicionalmente la especie *B. genistelloides* presenta flavonoides y *A. ciliata* presenta cumarinas además de alcaloides en las flores. El estudio espectroscópico muestra que todos los extractos evaluados presentan cierta absorbancia en la región UVB (280-320 nm) y UVA (320-400 nm), para su futuro estudio como extracto foto protector (San Martín et al., 2012).

Han efectuado análisis cualitativo y cuantitativo de los pigmentos antocianicos en cuatro frutas tropicales colombianas: uva de árbol, coral, mora pequeña y motilón, en cuyo extracto metanólico de estas frutas se determinaron por cromatografía HPLC del coral y el motilón, presencia de la antocianina delfinidina-3-rutinósido como compuesto mayoritario, seguido por delfinidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido y petunidina-3-rutinósido. En la mora pequeña se confirmó la presencia de cianidina-3-glucósido como compuesto mayoritario junto con cianidina-3-rutinósido; y en la uva de árbol identificaron la antocianina cianidina-3-glucósido como compuesto mayoritario junto con la antocianina delfinidina-3-glucósido. Posteriormente evaluaron la actividad antioxidante de los extractos de las cuatro frutas frente a los radicales libres ABTS y DPPH mediante espectroscopía UV-Vis. Con los resultados de espectroscopía UV-Vis determinaron que el extracto más activo fue el de motilón, seguido por el de uva, coral y mora (Santacruz Cifuentes, 2011).

Han evaluado el efecto de la temperatura sobre los compuestos bioactivos en papas nativas pigmentadas encontrando que estas disminuyen considerablemente por ejemplo las antocianinas totales de 59.21 a 19,35 (mg cianidina 3 glucosido/100g) en papas pigmentadas de pulpa morada (Condori & Aro, 2017).

Estudiaron el hongo *Botryodiplodia theobromae* por espectroscopia infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR) encontrando bandas más significativas a  $3274\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{OH}^{-1}$  inter o intramolecular),  $1078$  (C-O éter formando anillo o éter arílico),  $802$  (C-O-C éter arílico o cíclico), etc. todas estas características son de una estructura similar a un flavonoide del tipo antocianina (Castillo et al., 2010).

Han estudiado la *Berberis boliviana* Lechler (cheqche, queswa cheqche, quiscaquisca, ailampo), que es una especie silvestre del Perú, su fruto es una pequeña baya comestible de color morado. El análisis preliminar del pigmento determinó la presencia de antocianinas, cuyo contenido fue determinado por el método del pH diferencial, siendo de  $7\text{ g} / 100\text{ g}$  en el tejido separado de las semillas del fruto seco (Del Carpio Jiménez, Serrano Flores, & Giusti, 2009).

Determinaron que existe interés en las antocianinas debido a sus beneficios potenciales para la salud por su actividad antioxidante y su utilización como colorante natural en la industria alimentaria, por ejemplo en los arándanos, investigaron la influencia de variables del proceso de extracción sólido-líquido de antocianinas de arándanos. A partir de la caracterización del extracto obtuvieron que la concentración de antocianinas totales fue de  $879.0 \pm 12.9\text{ mg}$  cianidina-3-glucósido/100 mL, el contenido de fenoles totales de  $1424 \pm 67\text{ mg}$  GAE/100 mL y la actividad antioxidante de  $5730 \pm 103$  y  $4872 \pm 124\text{ mg}$  EAA/100 mL, medidos por los métodos ABTS y DPPH, respectivamente (L. M. Zapata et al., 2014).

Investigaron que antiguamente en la colonia los frutos del mio – mio (*Coriaria ruscifolia* L) se usaba para hacer tinta. Actualmente el jugo de los frutos se usa para teñir lanas y tejidos de oscuro a negro. También se usa en curtiembre. (Cajías & Fernandez, 1987).

Es en virtud a ello que el presente trabajo de investigación se centra en el estudio de este fruto del mio-mio con fines de uso agroindustrial y alimentario.

## CAPÍTULO II

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 2.1. Identificación del problema

Actualmente se cuenta con información precaria sobre la composición de compuestos bioactivos del mio mio (*Coriaria ruscifolia* L), por lo que el problema que existe es caracterizar, determinar los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de este fruto.

Se conjetura que tienen alto contenido en compuestos bioactivos y propiedades funcionales los frutos del mio- mio.

#### 2.2. Enunciados del problema objeto de investigación

¿En qué medida los frutos del mio-mio contienen compuestos bioactivos y capacidad antioxidante?

Pregunta General

¿Existe compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en los frutos del mio- mio?

Preguntas Específicas

¿Existe compuestos bioactivos en los frutos del mio-mio?

¿Existe compuestos antocianicos y polifenolicos en los frutos del mio-mio?

¿Existe capacidad antioxidante en los frutos del mio-mio?

### 2.3. Justificación de la investigación

Ante la creciente demanda de colorantes naturales tanto en la industria alimentaria y no alimentaria en todo el mundo se tiene una tendencia actual en limitar los colorantes sintéticos y preferir los colorantes naturales (Garzón, 2008b). Para ello se debe revalorar las técnicas ancestrales y adaptarlas a la tecnología actual para un uso adecuado y ecológico de estos ingredientes que antiguamente se usaban para colorear los alimentos como la ceniza, el azafrán, la cúrcuma, las moras o la clorofila. La decisión final de qué colorante usar dependerá del tipo de alimento que se esté desarrollando, sus características funcionales, preferencias de los consumidores, legislación vigente del uso de aditivos colorantes en alimentos en cada país (Ortega, 2004).

Actualmente diferentes trabajos de investigación han atribuido los efectos benéficos de la ingesta de polifenoles sobre la salud, especialmente sobre el sistema cardiovascular. Esto es importante, porque las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo. Los efectos de los polifenoles son fundamentalmente consecuencia de sus propiedades antioxidantes. Estos compuestos presentan efectos vasodilatadores, son capaces además de mejorar el perfil lipídico y atenúan la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), además presentan claros efectos antiinflamatorios y estos compuestos son a su vez capaces de modular los procesos de apoptosis en el endotelio vascular (Aguilera-Otíz et al., 2011).

Se ha atribuido a estos fitonutrientes un efecto protector en la prevención de procesos degenerativos de enfermedades cancerígenas y cardio y cerebrovasculares, dado que los antioxidantes poseen capacidad para neutralizar los radicales libres. Particularmente los jugos cítricos se caracterizan por una acumulación importante de flavonoides, fenilpropanoles y ácido ascórbico (Liu, 2004). Todos estos componentes son los responsables de proporcionar propiedades benéficas relacionadas con la salud.

El aumento de la prevalencia de las enfermedades crónicas no transmisibles relacionadas con la alimentación ha conducido a un mayor interés por estudiar la relación alimentación y salud. Se ha demostrado una menor incidencia de las mismas con patrones alimentarios que involucran un alto consumo de frutas y verduras, lo que ha motivado a investigar las propiedades químicas de estos alimentos. El efecto protector de los alimentos de origen vegetal se ha atribuido a diversos nutrientes y fitoquímicos con actividad antioxidante lo cual es frecuentemente olvidado en las recomendaciones alimentarias (Héctor et al., 2006).

Se tiene estudios que indican que los fitoquímicos funcionan como poderosos antioxidantes y reguladores del metabolismo que protegen contra el desarrollo de enfermedades crónicas que comienzan en la adultez. Según (Clark, 2013), los fitoquímicos ayudan a proteger contra diferentes tipos de cáncer, enfermedades del corazón, hipertensión y artritis. Algunas de las principales clases de fitoquímicos son los terpenos, los fenoles y los tioles.

Bajo este criterio en vista de que no se cuenta con mayor información de las características fitoquímicas, funcionales bioactivas del mio – mio (*Coriaria ruscifolia L*), es que se estudiará estos parámetros para su posterior uso especialmente los frutos de esta planta, que presentan colorantes muy apreciados en productos naturales como son las antocianinas, los mismos que se usan actualmente como alimentos funcionales por su gran capacidad antioxidante.

La importancia del presente trabajo de investigación es determinar si posee compuestos bioactivos, estos frutos del mio-mio fresco y seco para aplicar para fines agroindustriales

## **2.4. Objetivos de la investigación.**

### **2.4.1. Objetivo General**

Evaluar y caracterizar los compuestos bioactivos en frutos del mio mio (*Coriaria ruscifolia L*) por espectroscopia FTIR y HPLC.

#### 2.4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar los compuestos bioactivos en frutos del miomio (*Coriaria ruscifolia* L) por espectroscopia UV Visible, FTIR y Cromatografía HPLC.
- Determinar el contenido de antocianinas y polifenoles totales, en frutos del miomio (*Coriaria ruscifolia* L).
- Determinar la capacidad antioxidante, en frutos del miomio (*Coriaria ruscifolia* L).

#### 2.5. Hipótesis general y variable.

##### 2.5.1. Hipótesis general

Los frutos del mio-mio contienen compuestos bioactivos y capacidad antioxidante.

##### 2.5.2. Hipótesis específica

- Los frutos del mio-mio contienen compuestos bioactivos.
- Los frutos del mio-mio contienen antocianinas y polifenoles totales.
- Los frutos del mio-mio poseen capacidad antioxidante.

#### 2.6. Identificación de variables

Siendo este trabajo de investigación descriptiva de investigación básica y experimental, es considerada univariable.

### CAPÍTULO III

#### MATERIALES Y MÉTODOS

##### 3.1. Lugar de ejecución del trabajo de investigación

El proyecto de investigación se ha efectuado en el Laboratorio de Cromatografía y productos naturales, Laboratorio Químico de la UNSAAC – Cusco, de la EP de Ciencias Químicas, sito en el Campus Universitario de Perayoc, en la ciudad del Cusco, y en el laboratorio de química de la UNAMBA de la EAP de Ing. Agroindustrial.

##### 3.2. Población de estudio.

El mio – mio es un arbusto de frutos que tienen coloración rojiza siendo esta característica por la presencia de pigmentos antociánicos en la naturaleza (Figura 23). Los pigmentos del mio-mio se usan desde tiempos ancestrales como tinte natural para la fibra (Lock Sing de Ugaz, 1997).

El extracto presenta un tinte muy firme de color morado intenso y de las hojas se obtiene tanino para curtiembre. Para el teñido se usa los frutos maduros que por lo general son cosechados en el mes de julio. El color de colorante obtenido varía entre azulado a morado y color vino(Cajías & Fernandez, 1987).





Figura 23. Hojas y frutos (izquierdo), frutos frescos (medio) y frutos secos (derecho) del mio – mio (*Coriaria ruscifolia L.*)

### 3.3. Muestra.

Los frutos del mio – mio (*Coriaria ruscifolia L.*), fueron recolectados en la localidad de Tamburco sector de “El Mirador de Taraccasa” del distrito de Abancay, Región Apurímac – Perú, en el mes de enero del 2017.

#### 3.2.1 Materiales y equipos

- Balanza analítica Ohaus, Adventure (Parsippany, New Jersey).
- Baño termostático, Memmert GmbH & Co (Schwabach, Alemania).
- Espectrómetro Infrarrojo de Transformada de Fourier FTIR, Thermo Scientific Nicolet iS10 equipado con diamante ATR (Massachusetts, USA).
- HPLC Analítico Agilent 1200, con inyección manual y automática, acoplado a Detector de Masas de simple cuadrupolo, detector de arreglo de diodos y detector de índice de refracción series (Santa Clara, California).
- Micropipetas marca BOECO de volúmenes de 0.1-10  $\mu$ l; 10-100  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l (Hamburgo, Alemania).
- Refrigerador para almacenamiento de productos químicos, Whirlpool (Benton Harbor, Michigan).
- Rotaevaporador, Buchi R – 215 (Flawil, Suiza)
- Centrifuga, Centurión Scientific C2006
- Vortex, Scilogex compact MX- F
- Termómetro digital infrarrojo sin contacto, GM 300 rango (-32 a 350°C)

### 3.2.2 Reactivos

- Solventes de extracción, acetona, cloroformo, metanol (reactivos analíticos Fermont, distrito Federal México).
- Solventes para Cromatografía de Columna y ensayos de actividad antioxidante grado analítico metanol, etanol absoluto, isopropanol, acetato de etilo (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri).
- Ácido gálico para síntesis.
- Carbonato de sodio p.a.
- Reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu
- Metanol p.a. ACS.ISO. Reag. PhEur
- Potasio peroxodisulfato p.a. Sinónimo: Potasio persulfato, (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Cromatofolios Sílica Gel 20 x 20 cm (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Solventes para cromatografía grado HPLC metanol, isopropanol.
- Acetonitrilo (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri).
- Soportes cromatográficos DIAION HP-20 (Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japón).
- Cartucho Sep-Pak C18 corto, tamaño de partícula 55-105  $\mu\text{m}$ , tamaño de poro 125  $\text{\AA}$ , sustrato sorbente sílice, peso de sorbente 130 mg, rango de pH 2-8.
- Congeladora

### 3.4. Tipo y diseño de investigación

El presente trabajo de investigación es de tipo descriptivo, explicativo, estableciendo las características bioactivas de la materia prima. El método inductivo y deductivo de naturaleza experimental y cuantitativa.

A continuación se describe la unidad de análisis que en este caso es el fruto de mío - mío a diferentes estados de conservación para el desarrollo de esta investigación.

### 3.5. Análisis de las muestras

Se recolectó aproximadamente 2 kg de frutos nativos del mio-mio de los cuales se ha seleccionado y repartido en 3 grupos de 500 g cada uno, para diferentes estados de conservación de materia prima, es decir mio-mio fresco, congelado y seco, (Tabla 8) después se analizó sus compuestos bioactivos como son antocianinas, polifenoles totales y actividad antioxidante en cada estado de conservación.

#### 3.5.1. Estados de conservación de materia prima

- **Mio mio fresco:** Seleccionado previamente a partir de los arbustos y las hojas, fue lavado con abundante agua para posteriormente secar y mantener fresco para que sirva como muestra de control.
- **Mio mio congelado:** este proceso se efectúa inmediatamente a 500 g de frutos frescos del mio-mio a un proceso de congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de sus análisis respectivos.
- **Mio mio seco:** este proceso fue llevado a cabo secando a temperatura ambiente y en sombra 500 g de mio-mio fresco, el mismo que fue analizado en forma independiente sus componentes bioactivos.

Las temperaturas para cada caso fueron controladas con termómetro digital infrarrojo sin contacto.

**Tabla 8.** Temperatura y proceso de conservación de materia prima.

Muestra	Estado	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )
Mio mio fresco	Fresco	Temperatura ambiente
Mio mio congelado	Congelado	- $20^{\circ}\text{C}$
Mio mio seco	Seco	Temperatura ambiente

Luego de los procesos de cocción se almacenaron 100 g de muestras para los análisis de contenido de antocianinas, polifenoles totales y capacidad antioxidante en cada uno de los cuatro tratamientos y de cada uno de las variedades de las papas nativas pigmentadas. Después de los procesos de cocción las muestras se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

Los análisis en fresco también se efectuaron después de descongelar las muestras.

### 3.5 Parte experimental

#### 3.5.2. Extracción de antocianinas

La extracción del pigmento de antocianinas se desarrolló de acuerdo al método propuesto por (Aguilera-Otíz et al., 2011) con algunas modificaciones, se usaron como solventes metanol acidificado al 0.01% con HCl.

##### Procedimiento

1. Las muestras de frutos de mio mio frescos, congelados y secos fueron pesados entre 0.3 – 1 g según sea el caso el estado en que se encuentre la materia prima.
2. Seguidamente se añadió 20 mL de Metanol acidificado al 0.01% con HCl a los frutos respectivos en un mortero para su trituration y extracción sólido líquido y posterior filtración al vacío en papel Whatman número 40.
3. Luego el filtrado se concentró en un rotavapor a presión reducida de 100 mbar y 50 °C hasta 2/3 con respecto a su volumen inicial y este extracto concentrado se ha centrifugado y aforó a 10 mL con HCl 0.01% para evitar la oxidación del extracto y preservar a -20°C para posteriores análisis por triplicado en todos los casos.

#### 3.5.3. Purificación de las antocianinas extraídas usando C-18

##### Procedimiento

- El objetivo de usar este cartucho C-18 fue separar compuestos relativamente hidrofóbicos como las antocianinas de los azúcares y ácidos.
- Se activó el cartucho C-18 con metanol acidificado, haciendo pasar dos volúmenes del mismo (10 mL).
- Se retiró el metanol residual haciendo pasar a través del cartucho, tres volúmenes de agua acidulada (15 mL).

- Se hizo pasar 10 mL del extracto acuoso acidificado de antocianinas de frutos de mio mio a través del cartucho C-18, donde la fase sólida del cartucho se tornó coloreada, en los casos de que los pigmentos fueran muy coloreados se tomó 5 mL del extracto según era el caso. Luego se hizo pasar acetato de etilo en una cantidad necesaria para arrastrar las impurezas.
- Se lavó el cartucho con dos volúmenes de 15 mL de HCl (0.01%) para remover las sustancias que no fueron adsorbidas, como por ejemplo azúcares y ácidos orgánicos.
- Luego se recolectó la muestra con metanol acidificado, en unos viales resistentes al calor cubiertos con papel aluminio.
- Se retiró el metanol por evaporación en un baño isotérmico, a 40 °C, durante 5 a 10 min.
- Los pigmentos purificados se colocaron en los viales de HPLC para ser analizados por espectrofotometría UV-Vis, espectrometría FTIR, Cromatografía HPLC y demás análisis de compuestos bioactivos. De preferencia el HPLC fue realizado en el transcurso de dos horas, siendo luego las demás muestras conservadas en refrigeradora, a 4°C.

### 3.6 Caracterización de antocianinas.

#### 3.6.1. Espectro UV Visible de antocianinas

Para obtener el perfil UV visible de antocianinas presentes en la muestra, se purificó el extracto obtenido de la muestra con metanol acidificado en cartucho C-18 descrito anteriormente. Luego se leyeron las absorbancias en el espectrofotómetro UV-Vis Genesys desde 190 a 1100 nm de longitud de onda, para construir la curva de antocianinas con una velocidad de barrido de 4200 nm por minuto, velocidad de rotación de 11000 nm/min en cubetas de cuarzo de 10 mm de espesor, usando como blanco metanol(J. Harborne, 1958).

### 3.6.2. Espectro FTIR – ATR de antocianinas

El extracto fue sido solidificado a 50°C en una estufa, en luna de reloj de vidrio y luego fue aplicado en forma sólida en el aditamento ATR (Reflectancia total atenuada) del espectrómetro Infrarrojo de Transformada de Fourier FTIR Nicolet iS10, en el rango de infrarrojo medio de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Teniéndose en cuenta los siguientes parámetros de Método standard.

Numero de barridos de la muestra: 32

Numero de muestras de fondo: 32

Resolución: 4

Espaciado: 0.482  $\text{cm}^{-1}$ .

Ganancia de la muestra: auto ganancia.

Velocidad del espejo: 0.4747

Apertura: 80.00

El procesamiento e interpretación de los espectros se realizó usando el software Omnic.

### 3.6.3. Identificación de antocianinas por HPLC

Se usó la metodología propuesta por (GIUSTI & WROLSTAD, 1996), con algunas modificaciones.

#### Hidrólisis ácida de las antocianinas

Este método se basa en obtener los aglicones que son las antocianidinas, por separación de los azúcares y otras sustancias como ácidos ligados a la estructura de las antocianinas, con el único propósito de identificar las antocianidinas presentes en el pigmento.

#### Procedimiento

1. A 1 mL del extracto recientemente preparado y acidificado se le agregó 10 mL de HCl (3N) en un vial de 20 mL, luego se tapó herméticamente, se envolvió con papel aluminio y se sometió a la temperatura de ebullición en baño isotérmico, por triplicado.

2. Se hidrolizaron las tres muestras durante 45 minutos.
3. Después se colocaron los viales en un baño de hielo.
4. El hidrolizado se aplicó al cartucho C-18 previamente activado con metanol y enjuagado con agua acidificada.
5. Las impurezas fueron limpiadas con acetato de etilo (5 mL).
6. Se enjuagó con agua acidificada (10 mL).
7. Las antocianidinas se eluyeron con metanol acidificado (5 mL), se recolectó en viales de HPLC (1 mL), para ser analizadas en HPLC. Hasta realizar la lectura en HPLC la muestra se almacenó en refrigeradora y en oscuridad para proteger de la luz, ya que las antocianidinas son muy inestables y deben de ser analizadas preferiblemente dentro de los 60 min posteriores a su preparación.

#### 3.6.4. Caracterización de antocianidinas por HPLC

El HPLC es el método más común para realizar el análisis de antocianidinas. La muestra fue semipurificada usando un cartucho C-18 y la fracción fenólica (conteniendo antocianinas) fue eluída con metanol acidificado con HCl (1%). Se utilizó agua acidificada con HCl (0,01%) para lograr un volumen conocido.

La separación de las antocianidinas se llevó a cabo en una columna C-18 eclipse XDB – C-18 (4,6 mm x 150 mm, 5  $\mu$ m) usando un sistema HPLC Agilent Technologies, equipado con un detector con arreglo de diodos (DAD).

La presión de trabajo fue de 200 bar, el rango de flujo fue de 0.8 mL/min; la fase móvil fue una mezcla de eluyentes A y B constituidos de los siguientes solventes:

Eluyente A: 95% (Acido fórmico 10%) o Mezcla de ácido fórmico: agua (1:9).

Eluyente B: 5% Acetonitrilo (Acetonitrilo grado HPLC)

La fase móvil fue preparada con esta mezcla de eluyentes en gradiente como se observa en la tabla 9.

**Tabla 9.** Preparación de los gradientes de la fase móvil.

Tiempo (min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0.00	96.00	4.00
2.00	96.00	4.00
2.01	92.00	8.00
3.00	92.00	8.00
4.01	88.00	12.00
20.00	84.00	16.00
25.00	84.00	16.00
25.01	0.00	100
30.01	96.00	4.00

Se estableció un rango de flujo de 0.8 mL/min para obtener la separación adecuada de las antocianidinas presentes y se monitoreó a 520 nm, con un volumen de inyección de 1  $\mu$ L de muestra previamente purificada con cartucho C-18 antes descrito, a una temperatura de la columna de 30°C. Las condiciones del método de análisis de antocianidinas por HPLC se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10.** Condiciones para el análisis de HPLC

Instrumento	HPLC Agilent Technologies con detector DAD
Columna	Eclipse XDB-C18 columna, 4.6 mm x 150 mm 5 $\mu$ m
Temperatura de la columna	30 °C
Presión de trabajo	200 bar
Volumen de inyección	1 $\mu$ L
Rango de flujo	0.8 ml/min
Fase móvil	Eluyente A: Acido fórmico : agua (1:9) Eluyente B: Acetonitrilo
Gradiente	0 min; 96% A y 4% B; 2 min; 96% A y 4% B; 2.01 min; 92% A y 8% B; 3 min; 92% A y 8% B; 4.01 min; 88% A y 12% B; 20 min; 84% A y 16% B; 25 min; 84% A y 16% B; 25.01 min; 0% A y 100% B; 30 min; 96% A y 4% B.

La identificación de los picos de las antocianidinas fue realizada en base a la comparación de los cromatogramas a 520 nm y tiempos de retención de los extractos concentrados de antocianidinas de las especies (uva y fresa), corridos bajo las mismas condiciones



especificadas anteriormente para tener patrones de comparación que nos ayudaron a identificar los picos del cromatograma.

Los 5 aglicones (Halbwirth, 2010) (antocianidinas) patrón fueron de las especies *Vitis vinífera* (uva), y fueron: delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina en tanto que la antocianidina presente en *Fragaria vesca* (fresa) es la pelargonidina que no se encuentra presente en *Vitis vinífera* (uva) y los cromatogramas se presentan en las figuras 24 y 25, al igual que los espectros de las antocianidinas a 520 nm.



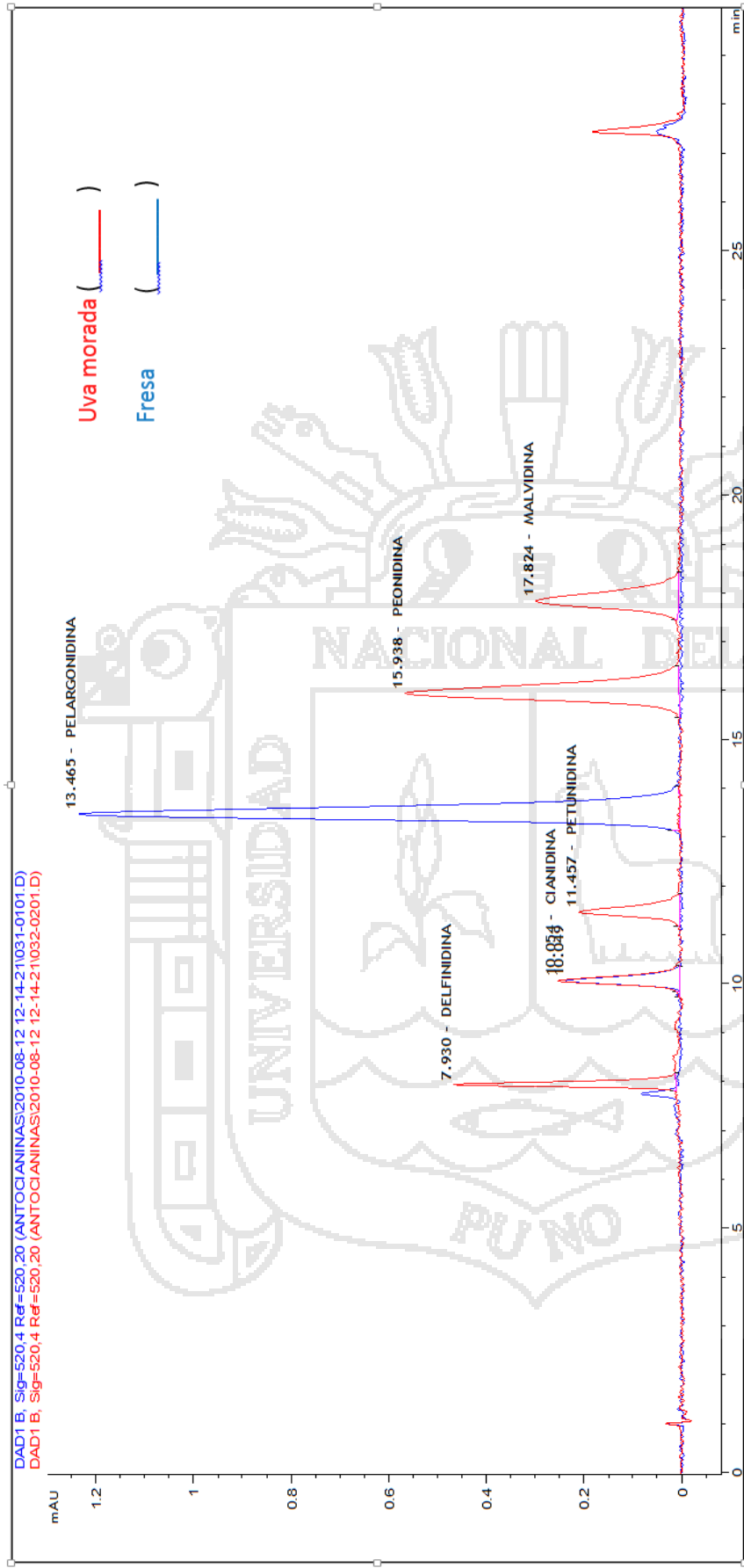


Figura 24. Cromatogramas de HPLC de antocianinas en uva morada y fresa usados como patrón o estándar. En color rojo (uva morada) y en color azul (fresa). Material proporcionado por el laboratorio de cromatografía (UNSAAC) del análisis de antocianinas de la uva y fresa.

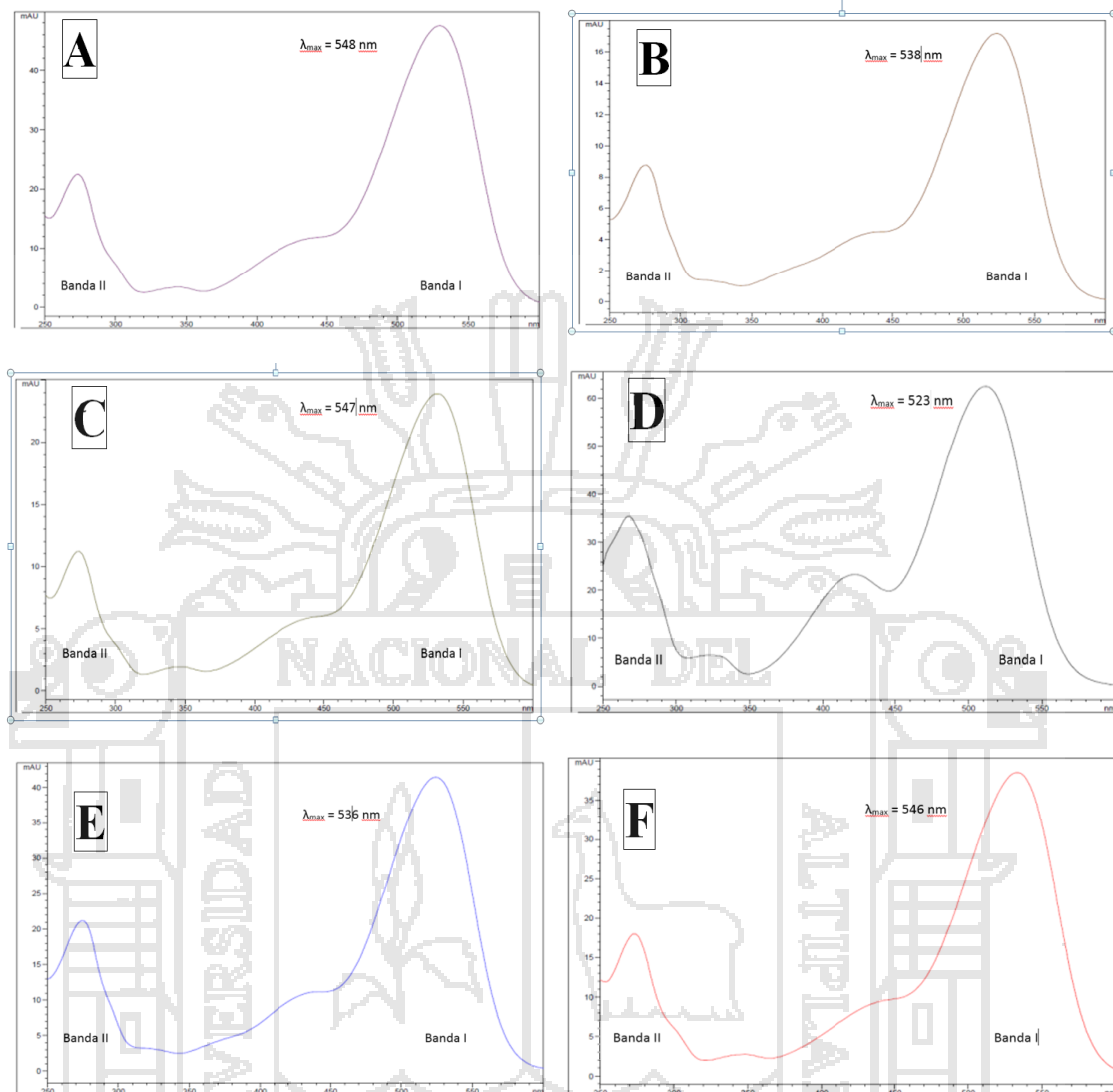


Figura 25. Reporte de espectros UV Visible a 520 nm de antocianidinas de uva y fresa por HPLC. Donde:

- A = Estándar delphinidina
- B = Estándar pelargonidina
- C = Estándar petunidina
- D = Estándar pelargonidina
- E = Estándar peonidina
- F = Estándar malvidina

Material proporcionado por el laboratorio de cromatografía (UNSAAC) del análisis de antocianidinas de la uva y fresa.

### 3.7 Determinación de contenido de antocianinas totales (CAT) mediante el método pH diferencial

La concentración de antocianina monomérica se determinó por el método de pH-diferencial propuesta por (Giusti & Wrolstad, 2001). Para ello, un alícuota de extracto de antocianina se mezcló con solución tampón a pH 1.0, de cloruro de potasio 0.025 M y otro con tampón a pH 4.5 de acetato de sodio 0.4 M. Este es un método espectrofotométrico que se basa en la transformación estructural de las antocianinas con el cambio de pH (pH 1 coloreadas y pH 4.5 incoloras). La diferencia en la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción (510 nm) es proporcional al contenido de antocianinas. Posteriormente y con el propósito de efectuar la corrección de la medida debida a la presencia de compuestos degradados o sustancias interferentes como el hemiacetal y chalcona, se midió la absorbancia a 700 nm.

Las mediciones se realizaron con un espectrofotómetro Genesys 10S modelo UV-VIS Espectronic, USA contra un blanco de agua ultra pura.

La concentración de las antocianinas se expresó como mg cianidina-3-glucósido/100mL. Los resultados se presentan en la tabla 11.

#### Procedimiento

- Se pesó una cantidad conocida de frutos de mio mio frescas, congeladas y secas de las cuales se procedió la extracción de sus pigmentos con Metanol acidificado (Ver extracción de antocianinas).
- Se determinó el factor de dilución apropiado para cada una de las mezclas mediante la dilución con el buffer de cloruro de potasio, pH 1, hasta que la absorbancia de cada una de las muestras a la máxima longitud de onda para antocianinas (520 nm) se encuentran dentro del rango 0 a 1 UA para cumplir la ley de Beer. Para determinar el factor de dilución (FD) se dividió el volumen final o (volumen de aforo) de la muestra a leer en el espectrofotómetro entre el volumen inicial o (volumen alícuota) que se tomó del extracto.

- Se prepararon dos diluciones de cada muestra por triplicado, una para medir la absorbancia a 520 nm y la otra a 700 nm, se usó el buffer cloruro de potasio (pH 1.0) y buffer acetato de sodio (pH 4.5) respectivamente, diluyendo cada uno con el factor de dilución previamente determinado. Dejando equilibrar estas diluciones durante 15 min.
- Luego de ello, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro para cada dilución final a las longitudes de onda antes indicadas usando como blanco agua destilada.
- Se calculó el cambio absorbancia (A) de la muestra diluida utilizando la siguiente fórmula:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4.5} \text{Ec. 1}$$

- Se calculó la concentración de pigmentos de antocianinas monoméricas en la muestra original empleando la siguiente fórmula:

$$CAT \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{A \times PM \times FD \times 1000}{\epsilon \times l} \text{Ec. 2}$$

- Para convertir el CAT en (mg/100g) se usa la siguiente ecuación:

$$CAT \left( \frac{mg}{100g} \right) = \frac{A \times PM \times FD}{\epsilon \times l} * \left( \frac{V}{W} \right) * 1000 \text{Ec. 3}$$

Donde:

A : Cambió en la absorbancia

CAT : Contenido de antocianinas totales (mg/L)

PM : masa molecular para cianidina-3-glucósido, 449.2 g/mol

$\epsilon$  : Coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido, 26900

L/mol.cm

l : Camino óptico de celda, 1 cm

- FD : Factor de dilución
- V : Volumen de aforo de extracto (mL)
- W : Peso muestra (g)

Se obtuvieron los cambios de absorbancias a diferentes pHs, obteniéndose los valores para cada extracto por triplicado (Tabla 11), se calculó primero el cambio de absorbancia A, de acuerdo a la ecuación 1 y se sustituyó este valor en la ecuación 3 de contenido de antocianinas totales CAT (mg/L).

**Tabla 11.** Valores para la determinación de contenido de antocianinas totales (CAT) en extractos de frutos de mio mio fresco.

Muestra	pH : 1.0		pH : 4.5		A	CAT (mg/L)	CAT (mg/100g)
	λ=520 nm	λ=700 nm	λ=520 nm	λ=700 nm			
MMF1	1.423	0.013	0.210	0.018	1.218	427.12	427.12
MMF2	1.520	0.011	0.233	0.002	1.278	448.16	448.16
MMF3	1.491	0.011	0.218	0.008	1.270	445.35	445.35

MMF = Mio mio fresco

CAT = Contenido de antocianinas totales.

Por ejemplo para el cálculo del contenido de antocianinas totales (CAT) en extractos de frutos frescos de mio mio se tiene:

Absorbancia (A) según la ecuación 1:

$$A = (1.423 - 0.013)_{pH\ 1.0} - (0.210 - 0.018)_{pH\ 4.5} = 1.218$$

FD = Factor de dilución

Por lo que el CAT ( mg cianidina 3-glucósido/L) según la ecuación 2 es:

$$CAT(mg/L) = \frac{1.218 \times 449.2 \frac{g}{mol} \times (21) \times 1000}{26900 \left(\frac{L}{mol.cm}\right) \times 1cm}$$

$$CAT(mg/L) = 427.12 \text{ mg cianidina 3 - glucósido/L}$$

Si V extracto = 10 mL

Peso muestra: W = 1 g

El CAT (mg cianidina 3-glucósido/100 g de peso fresco) según la ecuación 3 es:

$$CAT(mg/100g) = 427.12 (mg \text{ cianidina 3 - glucósido}/100 g \text{ de peso fresco})$$

Los resultados se muestran en la tabla 17, para n=3.

### 3.8 Determinación de polifenoles totales (PFT)

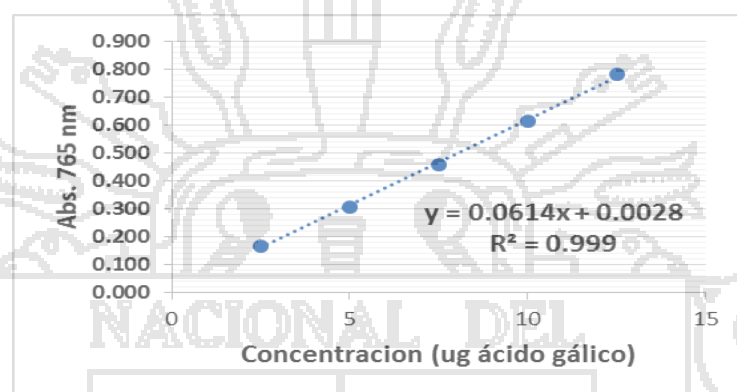
La cuantificación de polifenoles totales se llevó a cabo en los extractos anteriormente explicados, aplicando el método Singleton el cual se basa en la oxidación de compuestos fenólicos con el reactivo Folin - Ciocalteu, lo que genera una coloración azul medible a 750 nm, la cual es directamente proporcional al contenido de polifenoles (V. Singleton & Rossi, 1965).

#### 3.8.1 Preparación de la curva de calibración

Se utilizó una solución estándar de ácido gálico (100 µg/mL) de la cual se tomaron volúmenes entre 0 y 200 µL y se completó el volumen de cada uno a 2000 µL con solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7%), reactivo Folin (1N) (Tabla 12). Posteriormente se determinó la curva de calibración estándar del ácido gálico, a 765 nm, en un espectrofotómetro después de 30 min de reposo, efectuando con estos datos la curva de calibración.

**Tabla 12.** Datos para la obtención de la curva de calibración de fenoles totales.

Nº tubo	Solución de ácido gálico (µL)	Agua destilada (µL)	Reactivo Folin (µL)	Solución Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (µL)
Blanco	0	1700	100	200
1	50	1650	100	200
2	100	1600	100	200
3	150	1550	100	200
4	200	1500	100	200



*Figura 26.* Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

### 3.8.2 Procedimiento

De forma similar que en la Tabla 12 se procedió a ejecutar el procedimiento para los extractos de frutos del mio mio. Este procedimiento se efectuó por triplicado para cada muestra. Obteniéndose la absorbancia a 765 nm.

Los resultados fueron expresados en (mg ácido gálico/100g de muestra fresca) con la ecuación 5:

$$PFT \left( \frac{\text{mg ácido gálico}}{\text{litro}} \right) = \left[ \frac{\text{Abs.muestra} - A}{B} \right] * FD = FT1 \quad \text{Ec. 4}$$

$$PFT \left( \frac{\text{mg ácido gálico}}{100g} \right) = PFT \left( \frac{g ácido gálico}{100g} \right) * 1000 \quad \text{Ec. 5}$$

Donde:

PFT : Polifenoles totales

Abs<sub>muestra</sub> : Absorbancia de la muestra



- A : Intercepto
- B : Pendiente
- FD : Factor de dilución

Por ejemplo para el cálculo del contenido de polifenoles totales se tiene:

La ecuación de la curva patrón de ácido gálico:

$$Y = B X + A \tag{Ec. 6}$$

$$Y = 0.0287 X + 0.0958$$

Donde:

$$A = 0.0028$$

$$B = 0.0614$$

Reemplazando la absorbancia de la muestra en la ecuación 3 se obtiene polifenoles totales (PFT) en (mg de ácido gálico/L).

Factor de dilución = FD

$$\text{Abs (muestra)} = 0.549$$

Si V extracto = 10 mL

Peso muestra: W = 1 g

$$PFT \left( \frac{\text{mg ácido gálico}}{\text{litro}} \right) = \left[ \frac{0.549 - 0.0028}{0.0614} \right] * 5 * 40 = 1779.15$$

$$= FT1$$

$$PFT \left( \frac{\text{mg ácido gálico}}{100 g} \right) = 1.7779 * 1000 = 1779.15$$

Los resultados se muestran en la tabla 18, para n= 3.

### 3.9 Determinación de la capacidad antioxidante TEAC – ABTS por el ensayo de decoloración de radical catiónico del reactivo ácido 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).

El ensayo de decoloración con el radical catiónico ABTS<sup>•+</sup> se usó para determinar la capacidad antioxidante de los extractos de frutos de mio mio, usando el método propuesto por (Re et al., 1999), con algunas modificaciones.

#### 3.9.1 Preparación de la solución ABTS\* radical

- Se pesó 784 mg de ABTS y se aforó a 100 mL con agua destilada (Reactivo A).
- Se pesó 13.2 mg de persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ), se disolvió y aforó a 100 mL con agua destilada (Reactivo B).
- Se preparó la solución madre de ABTS\* radical, para ello se mezcló en proporción (1:1) en frasco ámbar, para luego adecuar su absorbancia entre 1.10 +/- 0.02, usando como blanco metanol y se guardó esta solución de ABTS\* diluido en frasco ámbar hasta su posterior uso.

#### 3.9.2 Solución de Trolox y construcción de la curva patrón

- Se preparó 5000  $\mu$ M de concentración de solución de trolox.
- De esta solución madre se midieron volúmenes (Tabla 13) y se aforaron a 2000  $\mu$ L, todas las soluciones, para construir la curva patrón de trolox.

**Tabla 13.** Concentraciones de trolox para elaborar la curva de calibración.

Tubo	Trolox V ( $\mu$ L)	Agua V ( $\mu$ L)	Conc. Trolox $\mu$ M ( $\mu$ mol/L)
1	0	2000	0
2	10	1990	100
3	80	1920	200
4	160	1840	400
5	200	1800	500
6	240	1760	600

- Se midió 950  $\mu\text{L}$  de ABTS\* diluido (Tabla 14) para cada una de las diluciones de la curva patrón y/o de las muestras, según sea el caso, y se midieron sus absorbancias en un espectrofotómetro a 734 nm en un tiempo inicial y después de 10 minutos una vez agregado a los tubos anteriores 50  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones de la curva patrón de trolox o de la muestra según sea el caso para aforar a 2000  $\mu\text{L}$  a las soluciones de ABTS\*
- Se calculó las diferencias de absorbancias del ABTS\*, (Tabla 14).

**Tabla 14. Volúmenes y concentraciones de Trolox y ABTS\* diluido.**

Tubo	Conc. Trolox mM (mmol/l)	V de Trolox ( $\mu\text{L}$ )	V de ABTS* Dil. ( $\mu\text{L}$ )	Dif. Abs. ABTS* (734 nm)
1	0	50	1950	0.0
2	0.025	50	1950	0.288
3	0.050	50	1950	0.322
4	0.100	50	1950	0.372
5	0.150	50	1950	0.477
6	0.200	50	1950	0.605

- Se construyó la curva patrón de trolox con concentración (mmol/L) de trolox Vs diferencia de absorbancias de ABTS\*.

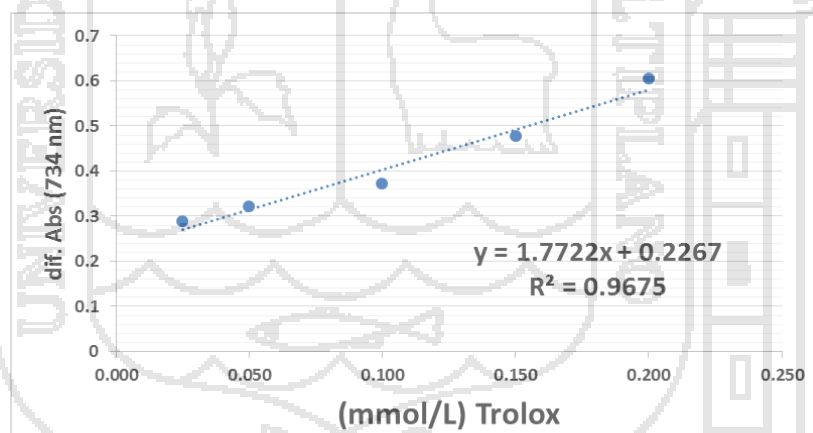


Figura 27. Curva patrón de trolox.

**Determinación de TEAC - ABTS en los extractos**

La capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) de un extracto, representa la concentración de solución de Trolox que tiene la misma capacidad antioxidante que el extracto. Los valores de TEAC para los extractos de muestras se determinaron como sigue:

- Para la extracción de los pigmentos de los frutos del mio mio se procedió como en el método de extracción antes descrito, para ello se pesó 1 g de frutos de mio mio y el extracto se aforó a 10 mL con HCl (0,01%) para su posterior análisis de capacidad antioxidante TEAC.
- Con los extractos problema se realizó la medición de las diferencias de absorbancias tal como se procedió para la curva trolox, por triplicado, obteniéndose datos de la tabla 15.

**Tabla 15. Absorbancias de extractos de frutos del mio mio fresco**

Tubo	V de Trolox (µL)	V de ABTS* dil. (µL)	Dif. Abs. ABTS* (734 nm)
1	50	1950	0.0
2	50	1950	0.385
3	50	1950	0.509
4	50	1950	0.955
5	50	1950	0.872
6	50	1950	0.929

MMF Fresco: extracto del mio mio fresco (n = 3).

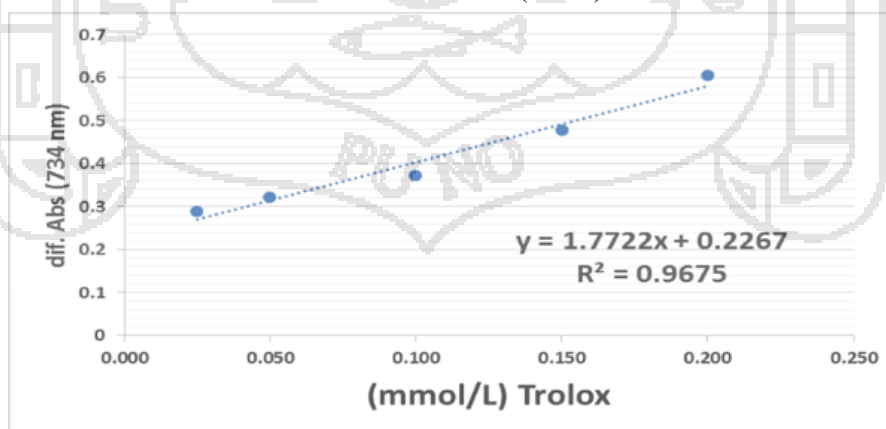


Figura 28. Curva patrón de trolox.

Cálculos para curva patrón de trolox:

$$Y = BX + A \quad \text{Ec. 8}$$

$$Y = 1.7722 X + 0.2267$$

A = intercepto = 0.2267

B = pendiente = 1.7722

$$X = (Y-A) / B$$

$$(\text{mmol/L}) = ((\text{Dif. Abs. ABTS}^*) - A) / B \quad \text{Ec. 9}$$

Para calcular la Capacidad antioxidante equivalente de trolox (TEAC – ABTS\*) se tiene la siguiente ecuación:

$$(\text{mmol TEAC/g}) = (((\text{dif. Abs. ABTS}^*) - A) / B) * (V/W) * \text{FD} * 0.001 \quad \text{Ec. 10}$$

Donde:

(mmol TEAC/g) = Capacidad antioxidante equivalente de trolox en (mmol/g de muestra).

Dif. Abs. ABTS\* = diferencia de absorbancias de t = 0 y t = 10 min

V = volumen de aforo de extracto (mL)

W = peso de muestra (g)

FD = factor de dilución

Por lo tanto el TEAC de los extractos de las muestras se ha calculado con la ecuación 10:

Si V extracto : V = 5mL

Peso muestra : W = 1 g de peso fresco.

FD = Factor de dilución

$$PM (\text{trolox}) = 250.29 \text{ g/mol}$$

$$A = \text{intercepto} = 0.2267$$

$$B = \text{pendiente} = 1.7722$$

$$(\text{mmol TEAC /L}) = ((\text{Dif. Abs. ABTS}^*) - A) / B$$

$$(\text{mmol TEAC /L}) = (0.385 - 0.2267) / 1.7722 = 0.089$$

Según la ecuación 10 se tiene:

$$(\text{mmol TEAC/g de peso fresco}) = ((0.385 - 0.2267) / 1.7722) * (5/1) * 100 * 20 * 0.001$$

$$(\text{mmol TEAC/g de peso fresco}) = 0.893$$

Para calcular el % de Inhibición:

Datos:

$$\text{Abs. inicial} = 0.941$$

$$\text{Abs. final} = 0.556$$

$$\% \text{ Inhibición} = (1 - (\text{Abs. final} / \text{Abs. Inicial})) * 100 \quad \text{Ec. 11}$$

$$\% \text{ Inhibición} = (1 - (0.556 / 0.941)) * 100$$

$$\% \text{ Inhibición} = 40.91$$

Los resultados se muestran en la tabla 19, para n=3.

### 3.9.3 Análisis estadístico

Los resultados se procesaron mediante un análisis de varianza y las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey con una significancia de 0.05 usando el software estadístico INFOSTAT Versión 2013 (Di Rienzo et al., 2011) y las correlaciones de Pearson mediante programa estadístico Statgraphics Centurión 5.1. Los resultados se observan en las tablas de resultados de los diferentes métodos de análisis.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Caracterización de los compuestos bioactivos en frutos del mio mio (*Coriaria ruscifolia* L)

##### De la identificación de antocianinas en extractos de frutos del mio mio mediante espectrofotometría UV-Visible

En las figuras 29 y 30 se presentan los espectros de absorción UV – Vis de los extractos metanólicos en medio ácido (HCl 0.01%) de frutos nativos del mio mio. Se observan valores máximos de absorbancia en 515 y 520 nm, que coinciden con las características de estructuras antociánicas ya establecidas con anterioridad por autores como (J. Harborne, 1958), (Lock Sing de Ugaz, 1997). Además el Análisis UV-Vis del extracto mostró una  $\lambda_{\max}$  en 290 y 300 nm, que pertenece al anillo aromático A de flavonoides (la banda benzoil o banda II) y la otra banda mayor a 500 nm pertenece al anillo aromático B (banda I o banda cinamoil) que corresponde a flavonoides del grupo de las antocianinas.

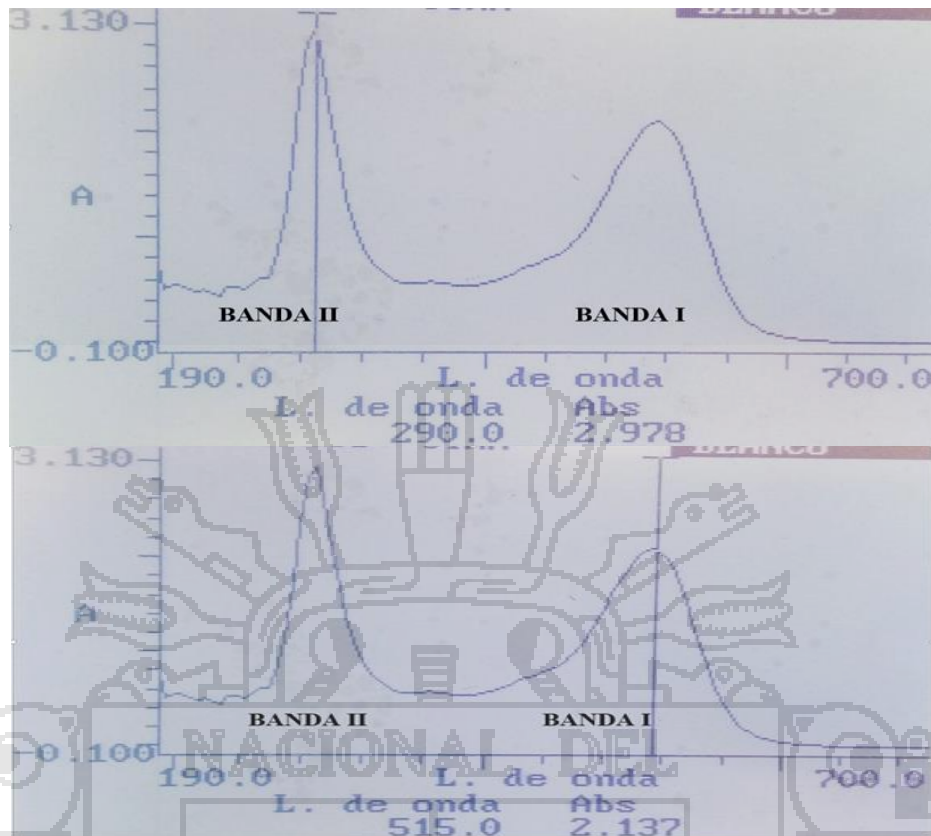


Figura 29. Espectros UV – Vis de antocianinas en extractos de frutos del mio mio fresco (MMF) indicando, (arriba)  $\lambda_{\max}$  en Banda I y (abajo)  $\lambda_{\max}$  Banda II

Los espectros UV-Vis de los frutos del mio mio fresco (MMF), presentan dos bandas de absorción máxima bien definidas. La banda I absorbe a una longitud promedio de 515 nm, mientras que la banda II absorbe a una longitud promedio de 290 nm (Ver figura 29). Con estos resultados, ya se pueden hacer conjeturas preliminares, con respecto a la identidad de los extractos aislados. Con la forma de los gráficos y la cantidad de picos máximos, se puede decir que los extractos podrían ser algún tipo de flavonoide en este caso del grupo de las antocianinas.



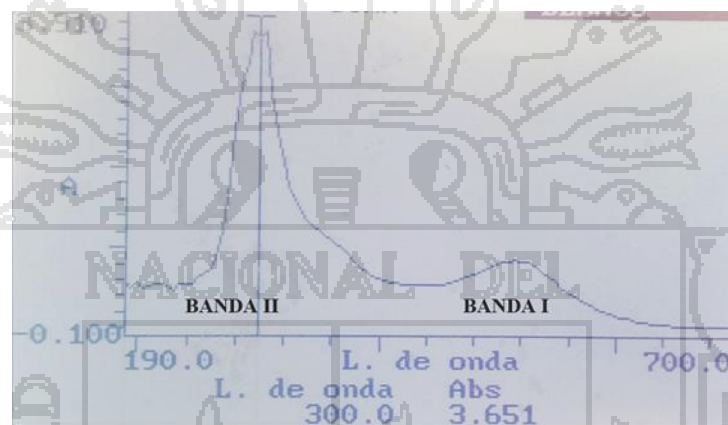
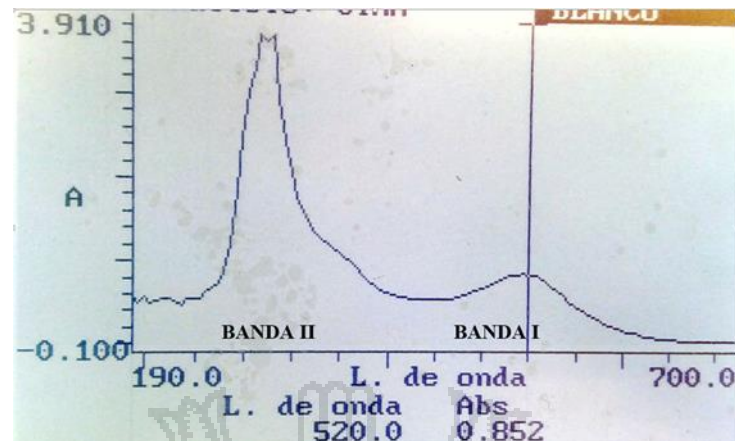


Figura 30. Espectros UV-Vis de antocianinas en frutos de mio mio seco (MMS), indicando (arriba)  $\lambda_{max}$  en Banda I y (abajo)  $\lambda_{max}$  Banda II

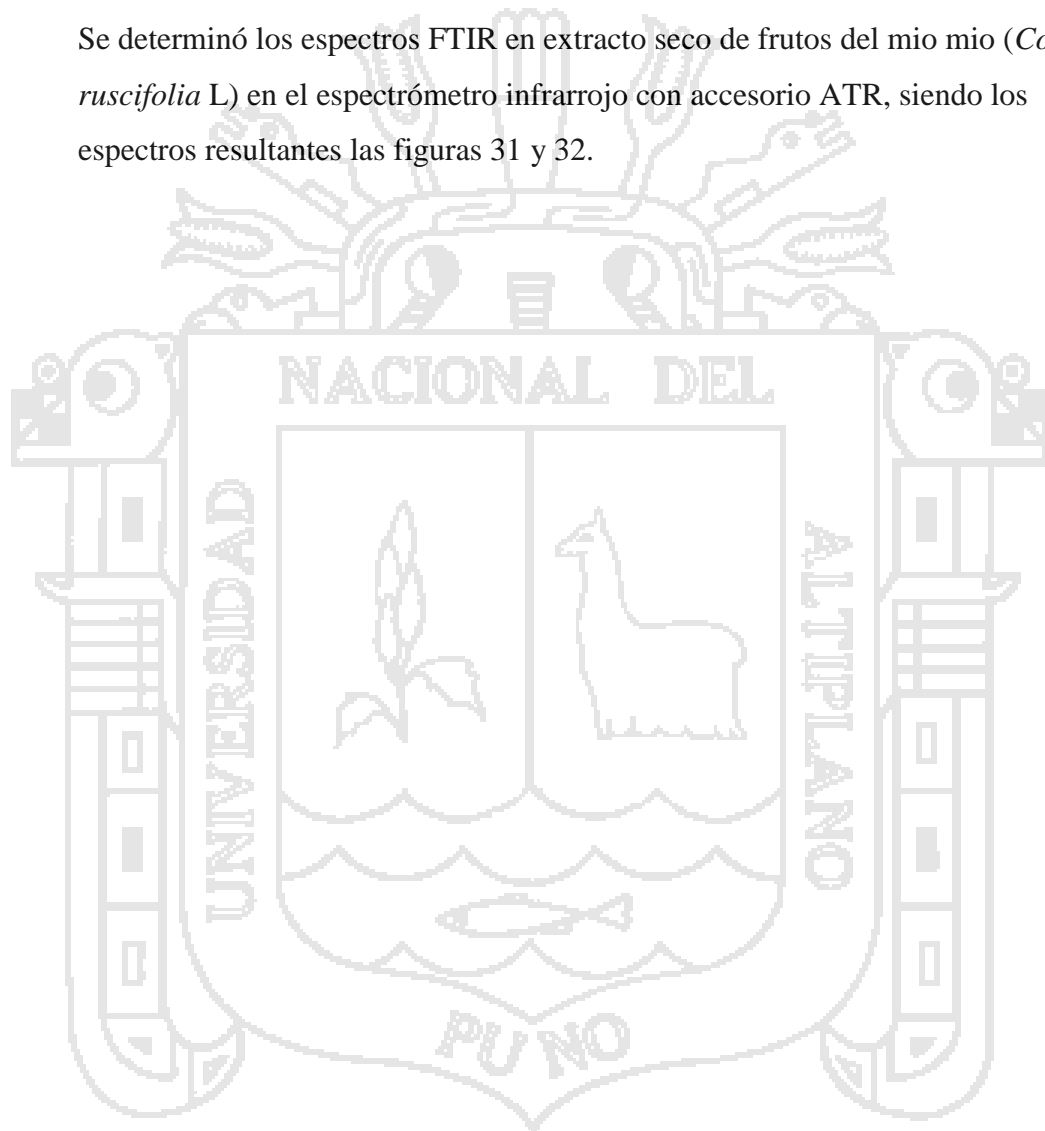
Los espectros UV-Vis de extractos de frutos de mio mio secos (MMS), presentan dos bandas de absorción máxima bien definidas. La banda I absorbe a una longitud promedio de 520 nm, mientras que la banda II absorbe a una longitud promedio de 300 nm (Ver figura 30). Con estos resultados, ya se pueden hacer conjeturas preliminares, con respecto a la identidad de los extractos aislados. Con la forma de los gráficos y la cantidad de picos máximos, se puede decir que los extractos podrían ser algún tipo de flavonoide en este caso del grupo de las antocianinas.

Se tienen trabajos de investigación de caracterización de flavonoides antociánicos en las que se presentan estas características en los espectros UV-Vis en los extractos flavínicos (Bedascarrasbure et al., 2006).

Han caracterizado por espectrofotometría UV Vis extractos de frutos de zarzamora encontrando la banda del anillo aromático A con un máximo de absorción en el rango 240-285 nm (banda benzoil) y otra banda del anillo B con máximo de absorción en el rango 300-550 nm (banda cinamoil) (Martínez-Cruz et al., 2011).

### **De la identificación de antocianinas en extractos de frutos del mio mio mediante espectroscopia FTIR - ATR**

Se determinó los espectros FTIR en extracto seco de frutos del mio mio (*Coriaria ruscifolia* L) en el espectrómetro infrarrojo con accesorio ATR, siendo los espectros resultantes las figuras 31 y 32.



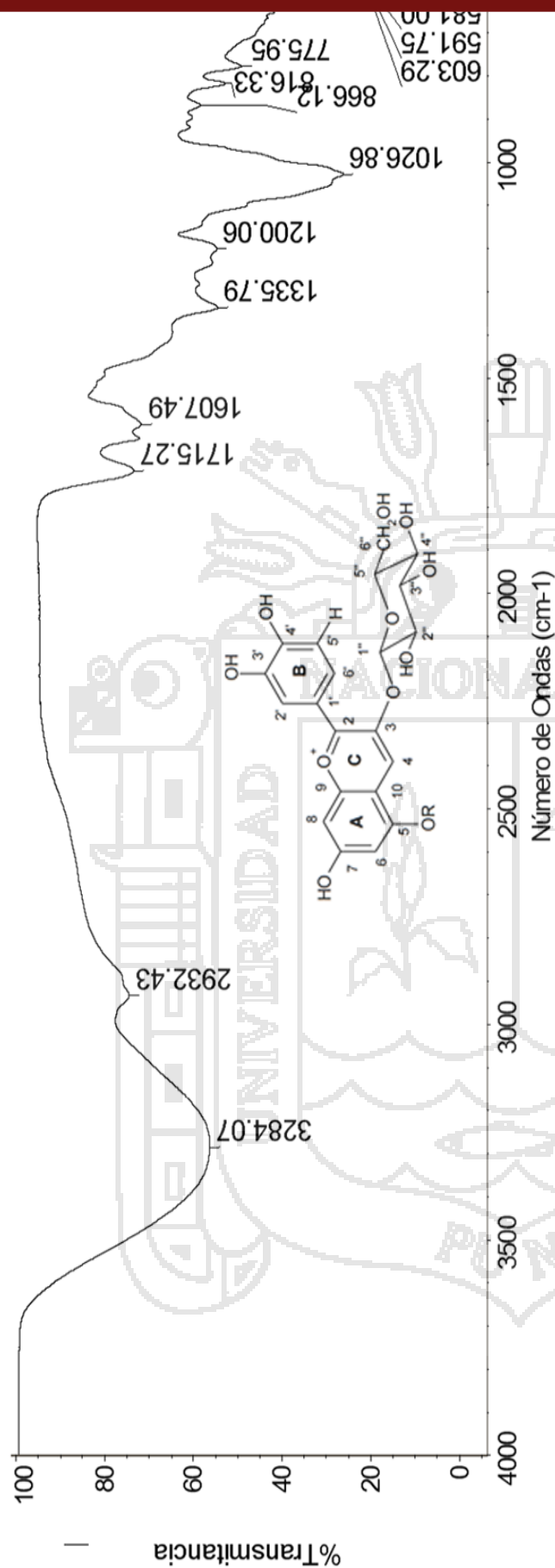


Figura 31. Espectro FTIR de antocianinas en extractos de frutos del mio mio fresco

El análisis de los espectros infrarrojo (FTIR) de los extractos de los frutos del mio mio fresco muestran bandas intensas en 3284 cm<sup>-1</sup> fuertes y anchas, características de los grupos hidroxilo (-OH) presentes comúnmente en compuestos fenólicos. Otras señales como a 1607 son producto del alargamiento de los dobles enlaces C=C de las estructuras aromáticas presentes en este tipo de antocianinas.

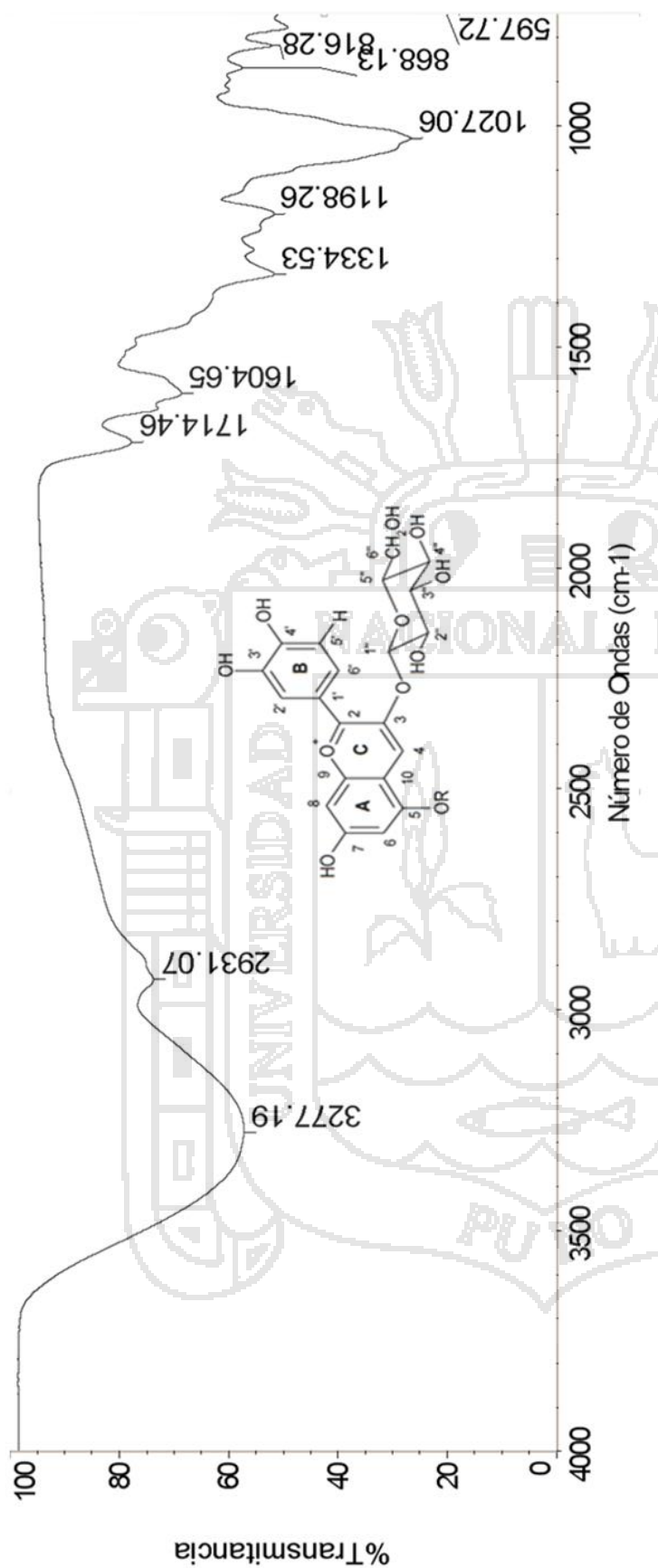


Figura 32. Espectro FTIR de antocianinas en extractos de frutos del mio mio seco.

El análisis de los espectros infrarrojo (FTIR) de los extractos de los frutos secos del mio mio muestran bandas intensas en 3277  $\text{cm}^{-1}$  fuertes y anchas, características de los grupos hidroxilo ( $-\text{OH}$ ) presentes comúnmente en compuestos fenólicos. Otras señales como a 1604 son producto del alargamiento de los dobles enlaces  $\text{C}=\text{C}$  de las estructuras aromáticas presentes en este tipo de antocianinas.

En las figuras 31 y 32 se pueden observar los espectros FTIR de los extractos de frutos del mio mio de ambas formas de preservación de estos frutos frescos y secos con sus respectivas atribuciones de frecuencias de vibración ( $\text{cm}^{-1}$ ), las mismas que se pueden ilustrar en la tabla 16, en la que se pueden observar fuertes señales de absorción a diferentes valores de frecuencias de vibración ( $\text{cm}^{-1}$ ) interpretados según (Pavia et al., 2008),

**Tabla 16.** Espectros FTIR – ATR ( $\text{cm}^{-1}$ ) con sus respectivas asignaciones de grupos funcionales

N°	Atribución	Referencia	Frecuencias de vibración ( $\text{cm}^{-1}$ )		
			Teórico	Mio mio Fresco	Mio mio Seco
1	OH <sup>-1</sup> (inter o intramolecular.)	Pavia (2014)	3200-3500	3277	3284
2	Estiramiento C-H	Pavia (2014)	2900-3000	2931	2932
3	C=O Acido carboxilico aromático	Pavia (2014)	1670-1690	1714	1715
4	Grupos carbonílicos C=O-	Pavia (2014)	1500-1670	1604	1607
5	Estiramiento C=C aromático	Pavia (2014)	1450-1600	1604	1607
6	Tensión C-O éteres aromáticos	Pavia (2014)	1000-1250	1213	1282
7	Vibración de tensión -C-O-C-	Pavia (2014)	1120-1250	1198	1200
8	v asim. =C-H (fenilos)	Pavia (2014)	1050	1027	1026
9	C-H aromático	Pavia (2014)	690 - 940	868	866

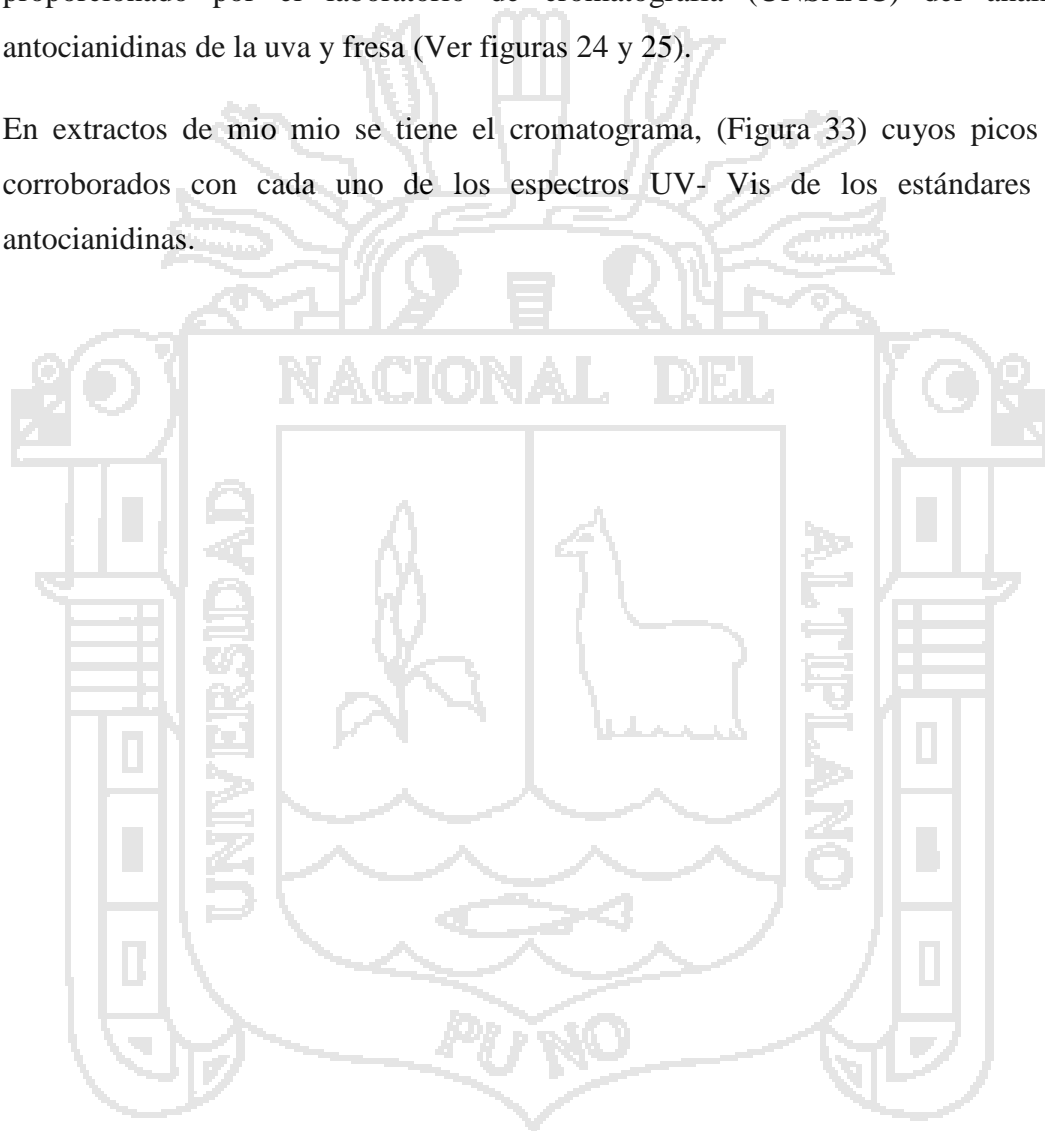
Fuente: (Pavia et al., 2008).

Observando los grupos funcionales indicados se puede deducir que corresponden a un compuesto antocianínico posiblemente glicosilado por presentar en ambos extractos de frutos del mio mio una elevada señal para grupos hidroxilo que indica el alto contenido en polifenoles en la matriz analizada. Lock et al., (1994) indica que la técnica IR en el análisis de flavonoides tiene características de absorción C=O entre 1680 y 1640, aromáticos entre 1600 y 1500 y la de -OH quelatado (o-hidroxicetona a 3500-3200 (de Ugaz, 1994).

### **De la identificación de antocianidinas en extractos de frutos del mio mio mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Esta identificación se efectuó por comparación de los picos que aparecen en cada una de los cromatogramas de extractos de mio mio en relación con los espectros UV- Vis de las antocianidinas estándar obtenidas a partir de los frutos de uva morada y fresa material proporcionado por el laboratorio de cromatografía (UNSAAC) del análisis de antocianidinas de la uva y fresa (Ver figuras 24 y 25).

En extractos de mio mio se tiene el cromatograma, (Figura 33) cuyos picos fueron corroborados con cada uno de los espectros UV- Vis de los estándares de las antocianidinas.



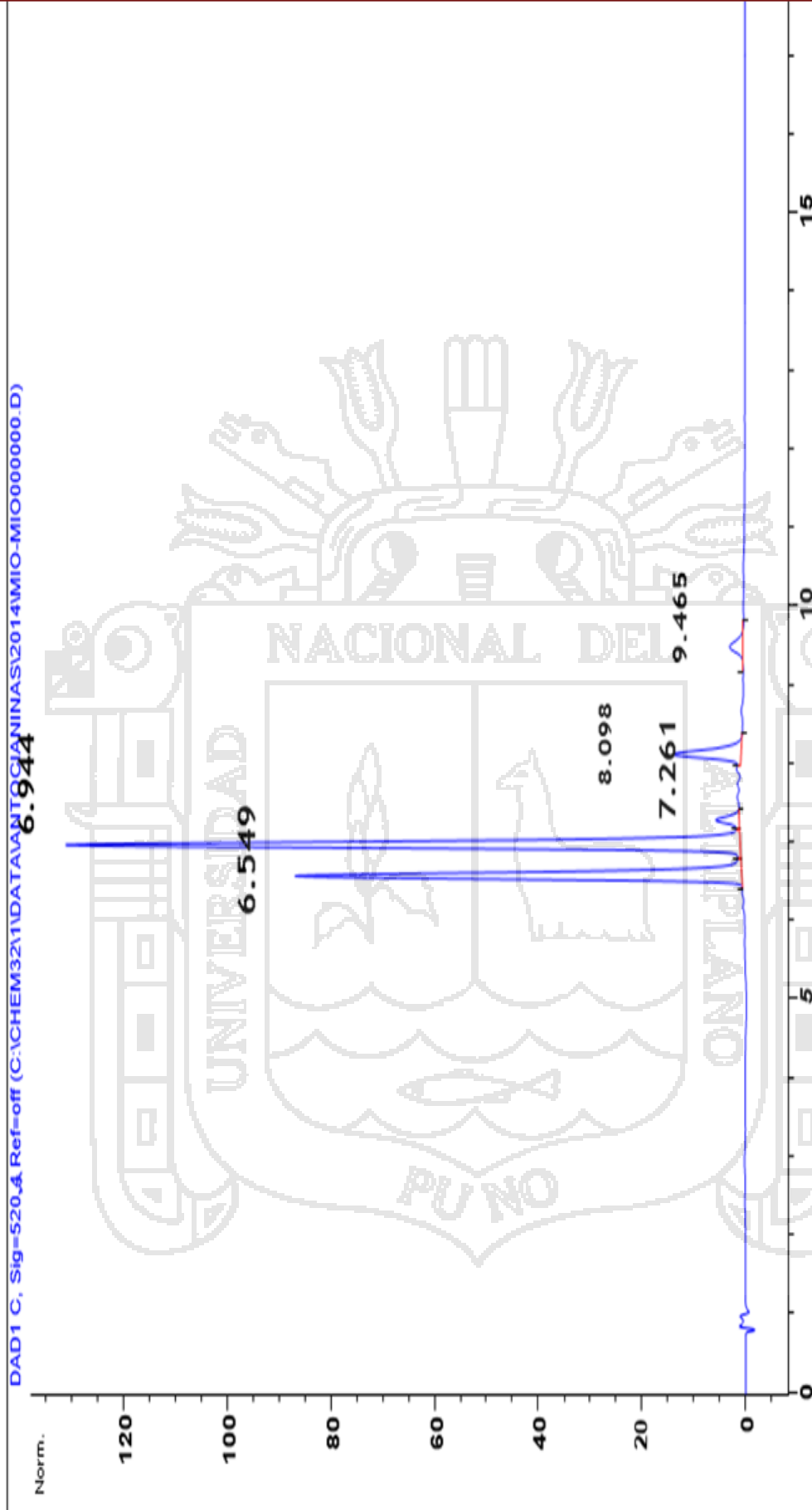


Figura 33. Cromatograma del extracto de frutos del mio mio. Columna Eclipse XDB-C18, detección a 520 nm.

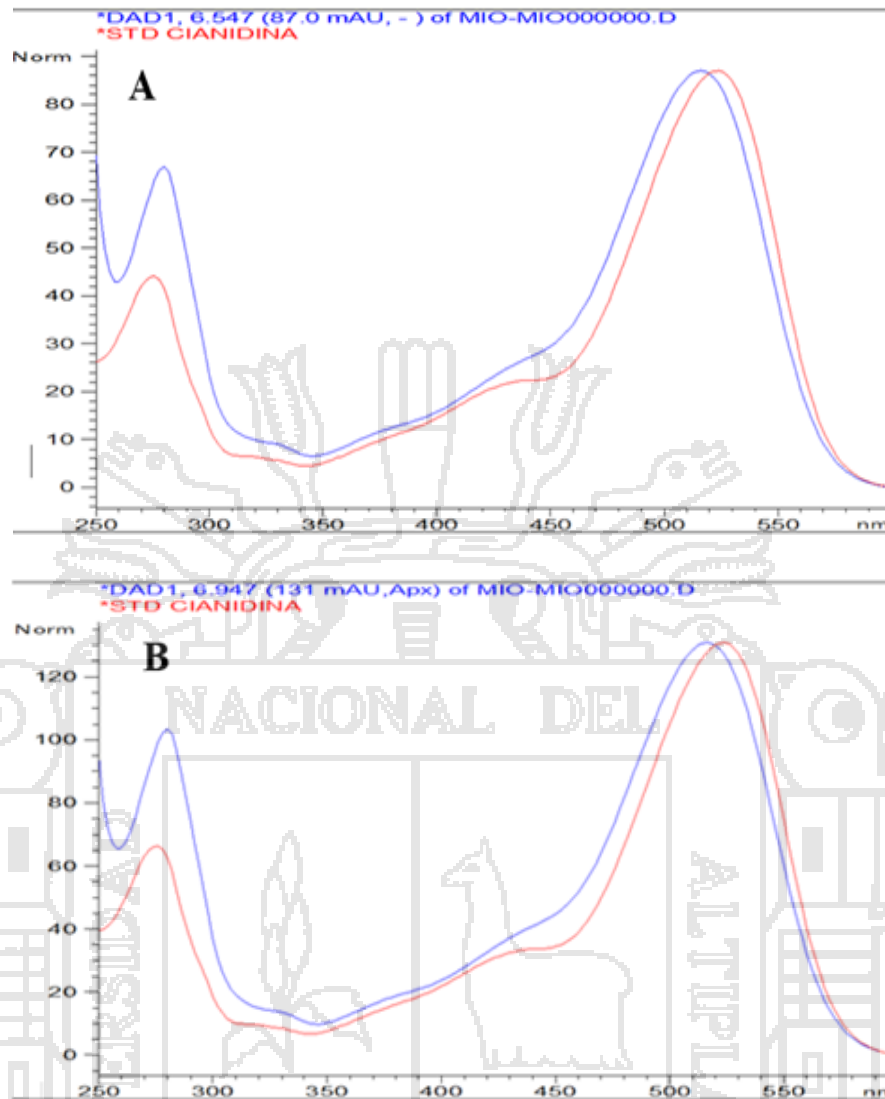


Figura 34. Resultados de espectros UV – Vis de antocianidinas del cromatograma HPLC de extracto de frutos del mio mio siendo los espectros de muestras (color azul) y de los estándares (color rojo) A: tR = 6.547 min y B: tR = 6.947 min.

Una vez comparado todos los picos del cromatograma HPLC de los frutos del mio mio se identificaron que los espectros UV-Vis antes citados se corresponden muy probablemente a los estándares de cianidina que fue retenida en un tiempo 6.547 min y 6.947, a diferencia que en este caso acompañados de diferentes tipos de azúcares en su estructura, que hacen haya diferencia en sus tiempos de retención.



Presentando su absorción máxima en 522.4 nm de longitud de onda, la ausencia de absorbancia en la región 310-335 nm permite afirmar que en ninguna de las dos moléculas existe acilación, lo que confirma que estamos frente a la antocianidina denominada cianidina, ya que este no presenta acilaciones en su estructura molecular.

Han estudiado por HPLC extractos monoméricos del capulí (*Prunus serotina* spp capuli (Cav) Mc. Vaug Cav), habiendo encontrado la Cianidina como componente mayoritario de este fruto (Hurtado & Pérez, 2014), del mismo modo (Del Carpio; Lechler, 2009) ha estudiado por HPLC los extractos hidrolizados de frutos del (*Berberis boliviana* L.), identificando antocianidinas agliconas del tipo cianidina, delfinidina, malvidina, peonidina y petunidina, similares a las del mio mio que a diferencia del anterior es un extracto constituido en su mayoría por la cianidina, presentando por esto en su mayoría el color rojo de sus frutos.

#### **4.2 Determinación del contenido de antocianinas y polifenoles totales, en frutos del mio mio (*Coriaria ruscifolia* L).**

##### **De la cuantificación de antocianinas totales (CAT) por el método de pH diferencial**

El contenido de antocianina monomérica o contenido de antocianinas totales (CAT) se determinó usando el Método de pH diferencial propuesta por (Giusti & Wrolstad, 2001), y efectuando los cálculos correspondientes se obtuvieron los resultados de la tabla 17.

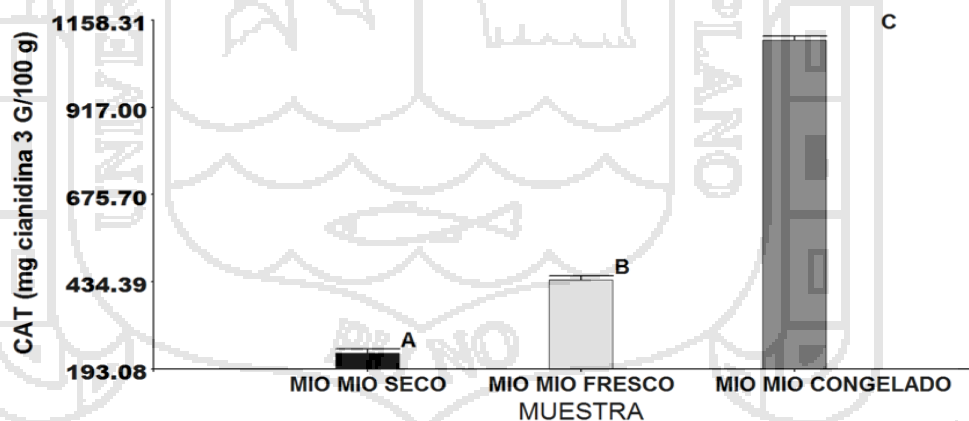
**Tabla 17.** Contenido de Antocianinas Totales CAT (mg cianidina 3-glucosido/100g) en extractos de frutos del mio mio.

Muestra	CAT (mg cianidina 3-glucosido/L)	CAT (mg cianidina 3-glucosido/100g)
MMF fresco	440.22 ± 11.42 <sup>b</sup>	440.22 ± 11.42 <sup>b</sup>
MMC congelado	220.57 ± 6.43 <sup>c</sup>	1102.88 ± 32.18 <sup>c</sup>
MMS seco	71.08 ± 1.81 <sup>a</sup>	236.96 ± 6.02 <sup>a</sup>

Datos expresados en media ± SD, n=3, p ≤ 0.05.

Letras diferentes dentro de columnas corresponden a diferencias significativas entre medias mediante la prueba de Tukey (α = 0,05).

En la figura 35 se pueden observar que comparando los extractos de mio mio congelado se incrementan con respecto al mio mio fresco y siendo menor el de mio mio seco, existiendo una diferencia significativa entre ellas como se observa en la tabla 18



*Figura 35.* Comparación de (CAT) en extractos de mio mio fresco, congelado y seco.

Medias de las letras diferentes se diferencian entre sí.

**Tabla 18.** Variación en los contenidos de antocianinas totales (CAT) en extractos de frutos del mio mio en diferentes estados de conservación.

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
CAT (mg cianidina 3 G/100 ..	9	1.00	1.00	3.37

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1230253.41	2	615126.71	1534.41	<0.0001
MUESTRA	1230253.41	2	615126.71	1534.41	<0.0001
Error	2405.32	6	400.89		
Total	1232658.73	8			

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=50.16024**

Error: 400.8871 gl: 6

MUESTRA	Medias	n	E.E.	
MIO MIO SECO	236.96	3	11.56	A
MIO MIO FRESCO	440.21	3	11.56	B
MIO MIO CONGELADO	1102.88	3	11.56	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Han investigado y cuantificado antocianinas en frutos de *elderberry* encontrado 416.3 (mg cianidina 3-glucosido/L fresco) de CAT (Bridle & Timberlake, 1997)similar a los encontrados en el presente trabajo de investigación en frutos frescos del mio mio que es de 440.22 (mg cianidina 3-glucosido/L fresco), también, (Neida & Elba, 2007), ha caracterizado los frutos del manaca (*Euterpe olerácea* Mart.) encontrando el contenido de sus antocianinas totales que varían de 730 a 1600 (mg cianidina 3-glucosido/100g) en la primera y segunda cosecha, del mismo modo (Eugenia Marta Kuskoski, Asuero, Morales, & Fett, 2006)estudiaron pulpa de frutos tropicales silvestres, determinando su contenido de antocianinas totales CAT en solución metanólica del jambolao y baguazu de 108.8 y 596.4 (mg cianidina 3-glucosido/100g peso fresco). Daniel et al., (2005)(Daniel) encontraron en frutos maduros de zarzamora el contenido de antocianinas totales CAT de 183.63 (mg cianidina 3-glucosido/100g peso fresco), al igual que (Bermúdez, Díaz-Moreno, & Fuenmayor, 2016) estudiaron el contenido de antocianinas totales en extractos del exocarpo del corozo (*Bactris guineensis* L.) encontrando 124 (mg cianidina 3-glucosido/100g peso fresco), siendo estos valores menores a los extractos de frutos del mio mio frescos efectuados en este trabajo de investigación.

De la misma manera (C. Muñoz et al., 2008), hicieron estudios en arándanos encontrando 118.4 (mg cianidina 3-glucosido/100g peso fresco) de CAT, de forma similar encontró en el mortiño 200.6 (mg cianidina 3-glucosido/100g peso fresco) de CAT todos estos resultados se encuentran dentro del rango del contenido de antocianinas, siendo el fruto del mio mio con 440.22 (mg cianidina 3-glucosido/100g peso fresco) el de mayor contenido de CAT frente a los anteriores frutos superado solo por los frutos del blue berry que esta entre 60 y 480 (mg cianidina 3-glucosido/100g peso fresco) de CAT según (Rein, 2005a), siendo por consiguiente los frutos del mio mio una prometedora fuente de antocianinas como pigmentos naturales.

Han investigado el CAT en arándanos secados en estufa (García Pastor, 2016) que fue de 400 (mg cianidina 3-glucosido/100g muestra seca), por efecto de deshidratación controlada de estos frutos, en forma similar otros investigadores corroboran este comportamiento (Fan-Chiang & Wrolstad, 2005), del mismo modo (Rockenbach et al., 2011) evaluaron el contenido de antocianinas totales en orujos de uvas rojas de distintas variedades y hallaron que varían desde 184 a 1122 (mg cianidina 3-glucosido/100g peso seco), siendo en este caso el valor de contenido de antocianinas totales en el mio mio seco de 236.96 (mg cianidina 3-glucosido/100g peso seco) el mismo que se encuentra en este rango antes citado.

Han estudiado el efecto de la conservación por congelamiento a diferentes temperaturas sobre el contenido de antocianinas totales en frutos de mora *Rubus glaucus Benth* (León & Elisa, 2012), encontrando que a bajas temperaturas de conservación por ejemplo a (4°C) el contenido de antocianinas se incrementa de 28 a 85 (mg cianidina 3-glucosido/100g), lo cual indicaría que ésta podría ser una buena temperatura para estimular los contenidos de dichos compuestos de alto potencial antioxidante, pero también este incremento se debería a la concentración de estos compuestos en el fruto, por pérdida de líquidos (% humedad) en los que no son miscibles las antocianinas, lo cual corrobora el incremento de CAT en este trabajo de investigación por efecto de conservación en congelamiento (-20°C) al cual fue sometido los frutos de mio mio incrementando su CAT de 440.22 a 1102.88 (mg cianidina 3-glucosido/100g), en forma similar (Barragan Condori &

Aro Aro, 2017) han estudiado la degradación de las antocianinas en papas nativas pigmentadas por efecto de la temperatura de cocción por horno microondas disminuyendo de 59.21 a 4.63 (mg cianidina 3-glucosido/100g peso fresco), en forma similar (Zhao, 2007) explica que el color de los frutos a medida que va transcurriendo el almacenamiento, se va haciendo menos intenso, esto podría deberse a reacciones degradativas de las antocianinas por efectos del proceso de senescencia de los frutos.

También, una vez que los frutos han presentado daños físicos las reacciones de oxidación inducidas por radicales libres o catalizadas por enzimas, inducen la descompartimentación celular y contribuyen a la pérdida de color en los frutos, de hecho, esto se presentaría debido a que los diversos compuestos polifenólicos no antocianínicos, son sustratos de fácil oxidación en el manejo postcosecha, esto implica que en el presente trabajo de investigación el extracto de mio mio seco disminuyó su CAT a 236.96 (mg cianidina 3-glucósido/100 g en peso seco) con respecto al fresco que fue de 440.21 (mg cianidina 3-glucósido/100 g en peso fresco) esto evidencia que hubo una degradación de las antocianinas en el mio mio seco, producto de la temperatura de secado de estos frutos a temperatura ambiente y almacenado durante más de 6 meses.

#### **De la cuantificación de polifenoles totales (PFT) por el método Folin - Ciocalteu**

El contenido de polifenoles totales PFT (mg ácido gálico/100 g) se determinó usando el Metodo Folin Ciocalteu para evaluar el contenido de polifenoles totales en extractos de frutos de mio mio. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico/100 g de muestra. Las determinaciones se hicieron por triplicado y efectuando los cálculos correspondientes se determinó los resultados que a continuación se detallan en la tabla 19.

**Tabla 19.** Contenido de polifenoles totales PFT (mg ácido gálico / 100g)

Muestra	PFT (mg ácido gálico /100g)
MMF Fresco	1820.41 ± 35.73 <sup>a</sup>
MMC Congelado	2317.70 ± 24.01 <sup>b</sup>
MMS Seco	5764.02 ± 205.24 <sup>c</sup>

Datos expresados en media ± SD, n=3, p ≤ 0.05.  
 Letras diferentes dentro de columnas corresponden a diferencias significativas entre medias mediante la prueba de Tukey (α = 0,05).

**Tabla 20.** Variación en los contenidos de polifenoles totales (PFT) en extractos de frutos del mio mio en diferentes estados de conservación.

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
PFT (mg ac. Galico/100g)	9	1.00	1.00	3.67

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	27676596.91	2	13838298.46	943.95	<0.0001
MUESTRA	27676596.91	2	13838298.46	943.95	<0.0001
Error	87960.15	6	14660.02		
Total	27764557.06	8			

**Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=303.33039**

Error: 14660.0249 gl: 6

MUESTRA	Medias	n	E.E.
MIO MIO FRESCO	1820.41	3	69.90 A
MIO MIO CONGELADO	2317.70	3	69.90 B
MIO MIO SECO	5764.03	3	69.90 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Se puede manifestar que existe una diferencia significativa en cuanto a contenido de polifenoles totales PFT en comparación de los tres estados de extracto de mio mio, siendo el mayor el del extracto del mio mio seco seguida del congelado (figura 36), el mismo que se debe a la alta concentración de sólidos totales, esto por disminuir su porcentaje de humedad durante el proceso de secado y congelación con respecto al mio mio fresco.

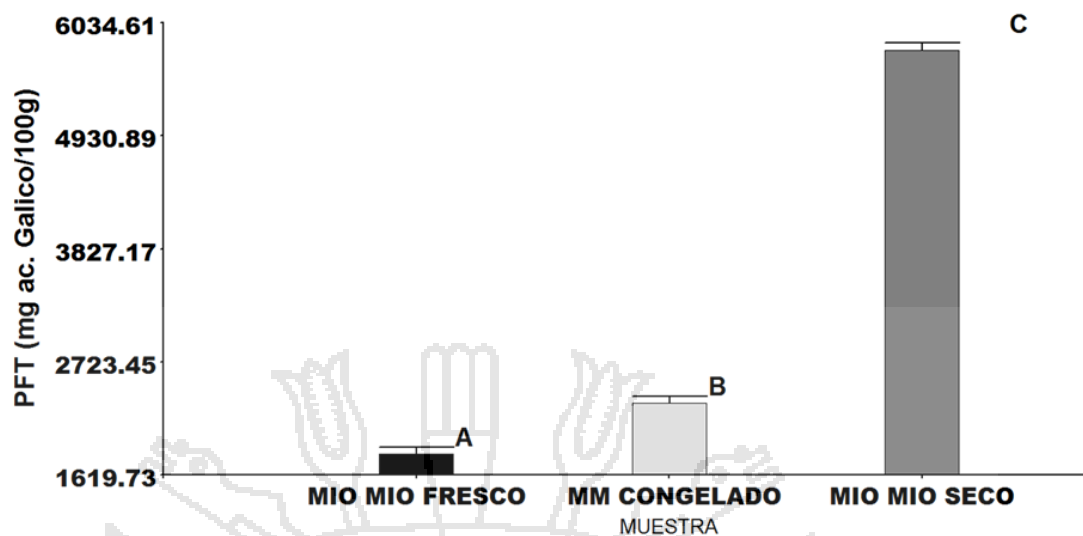


Figura 36. Comparación de (PFT) Polifenoles Totales en extractos de frutos de mio mio.

Medias de las letras diferentes se diferencian entre sí.

Hicieron trabajos de investigación en la determinación de polifenoles totales en zarzamora (Daniel), encontrando PFT de 477.1 (mg ácido gálico / 100g peso fresco), del mismo modo (Wang & Lin, 2000) determinó hasta 248 (mg ácido gálico / 100g peso fresco) de PFT en zarzamorras, siendo estos valores menores a los extractos de frutos del mio mio frescos efectuados en el presente trabajo de investigación.

Investigaron el contenido de polifenoles totales en especies de *Wild berries Rosehip*, (Guerrero et al., 2010) encontrando que sus polifenoles totales varían desde 245 hasta 1457 (mg ácido gálico / 100g), (E Marta Kuskoski et al., 2005) reportaron resultados de polifenoles totales en cereza y mango de 580.1 y 544.9 (mg ácido gálico / 100g de peso fresco), posteriormente el mismo autor (Eugenia Marta Kuskoski et al., 2006) investiga en pulpa de frutos tropicales silvestres el contenido de polifenoles totales en solución metanólica del jambolao y baguazu determinando 194.7 y 897.6 (mg ácido gálico / 100g de peso fresco) respectivamente, siendo notablemente mayor el contenido de PFT en frutos de mio mio fresco que es 1820.41 (mg ácido gálico / 100g) materia del presente trabajo de investigación el mismo que sería de beneficio como antioxidante en el uso alimentario.

Efectuaron investigaciones de polifenoles totales en extractos de granadilla y maracuyá (Carvajal de Pabón et al., 2011), encontrando 229 y 282 (mg ácido gálico / 100g de extracto seco) respectivamente, del mismo modo (Beltrán-Orozco, Oliva-Coba, Gallardo-Velázquez, & Osorio-Revilla, 2009b) cuantificaron los polifenoles totales en el pitaya (*Stenocereus stellatus Riccobono*) variando desde 1384 a 2395 (mg ácido gálico / 100g de materia seca), además de (Haytowitz & Bhagwat, 2010) cita de fuentes de USDA que el contenido de polifenoles en canela y romero es de 4533 y 4980 (mg ácido gálico / 100g peso seco) respectivamente, siendo estos valores similares y mayores a los reportados en este trabajo de investigación de extractos de frutos del mio mio seco que es de 5764.03 (mg ácido gálico / 100g peso seco).

Han estudiado el efecto de la conservación por congelamiento a diferentes temperaturas sobre el contenido de polifenoles totales (PFT) en frutos de mora *Rubus glaucus Benth* (León & Elisa, 2012), encontrando que a bajas temperaturas de conservación por ejemplo a (-4°C) el contenido de polifenoles totales se incrementa de 297 a 400 (mg ácido gálico / 100g), lo cual indicaría que ésta podría ser una buena temperatura para estimular los contenidos de dichos compuestos de alto potencial antioxidante, pero también este incremento se debería a la concentración de estos compuestos en el fruto, por pérdida de líquidos (% humedad) en los que no son miscibles las antocianinas tal como ocurre en los extractos de frutos de mio mio que aumenta de 1820.41 a 2317.70 (mg ácido gálico / 100g) en frutos congelados con respecto al fruto del mio mio fresco.

Encontraron que el contenido de polifenoles totales PFT evaluadas en extractos foliares de *Vaccinium ashei* (Gozzi, 2011), se han incrementado de 53.73 a 138.25 (mg ácido gálico / 100g) en hoja fresca y seca respectivamente, al igual que en el presente trabajo de investigación se puede observar también el incremento desde 1820 a 5764 (mg ácido gálico / 100g) del extracto del mio mio fresco y seco respectivamente, esto por la concentración de materia seca en la materia prima, que al disminuir el % de humedad incrementa dicho compuesto bioactivo.



**4.3 Determinación de la capacidad antioxidante, en frutos del mio mio (*Coriaria ruscifolia* L).**

**De la determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS (2, 2'-azino - bis (3 - etilbenzotiazolina - 6 - sulfónico)**

Se ha medido la capacidad antioxidante de extractos de frutos de mio mio por el método ABTS según (Re et al., 1999), el mismo que fue evaluado en cada uno de los extractos. La capacidad antioxidante se calculó usando una curva estándar de Trolox, y los resultados se expresan como (equivalente Trolox  $\mu\text{mol/g}$  de muestra). Se determinó por triplicado, considerando la absorbancia a 515 nm teniendo los siguientes resultados tal como se detalla (Tabla 21):

**Tabla 21.** Determinación de capacidad antioxidante por el método TEAC - ABTS, de extractos de frutos de mio mio.

Papas pigmentadas	TEAC - ABTS ( $\mu\text{mol Trolox/g}$ )	TEAC - ABTS ( $\text{mmol Trolox/g}$ )	TEAC - ABTS ( $\text{g Trolox/g}$ )	% Inhibición
MMF Fresca	739.92 $\pm$ 25.14 <sup>a</sup>	0.74 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	185.19 $\pm$ 6.29 <sup>a</sup>	70.70 $\pm$ 10.51 <sup>a</sup>
MMC Congelada	1873.93 $\pm$ 169.49 <sup>b</sup>	1.87 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	432.45 $\pm$ 42.42 <sup>b</sup>	97.76 $\pm$ 1.48 <sup>b</sup>
MMS Seca	2792.19 $\pm$ 140.05 <sup>c</sup>	2.79 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>	698.86 $\pm$ 35.05 <sup>c</sup>	77.57 $\pm$ 0.93 <sup>c</sup>

Datos expresados en media  $\pm$  SD, n=3, p < 0.05.  
Medias de las letras diferentes se diferencian entre sí.

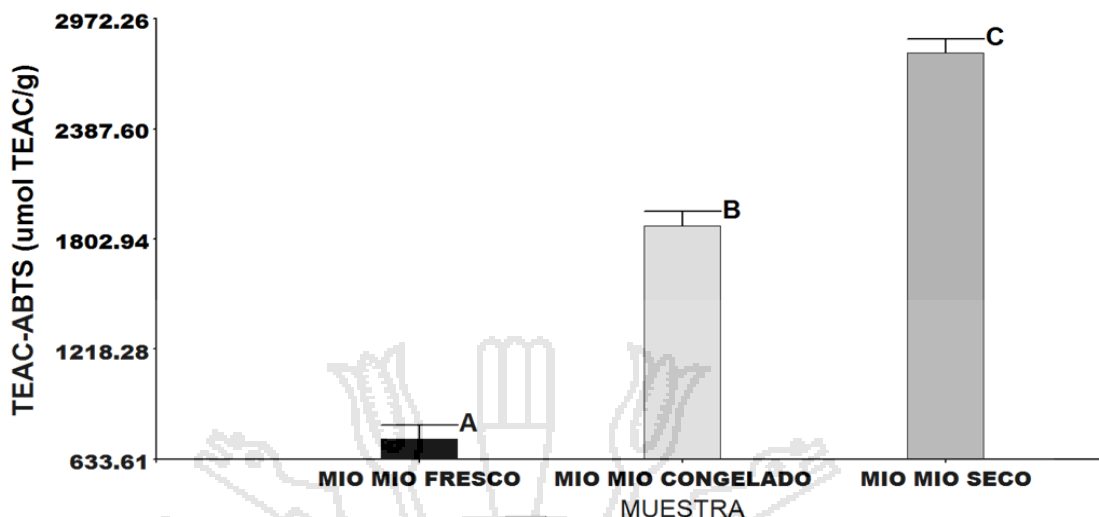


Figura 37. Comparación de capacidad antioxidante TEAC-ABTS\* en extractos de frutos de mio mio.

Medias de las letras diferentes se diferencian entre sí.

Tabla 22. Variación en los contenidos de TEAC-ABTS en extractos de frutos del mio mio en diferentes estados de conservación.

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
TEAC-ABTS (umol TEAC/g)	9	0.98	0.98	7.09

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6341013.50	2	3170506.75	194.22	<0.0001
MUESTRA	6341013.50	2	3170506.75	194.22	<0.0001
Error	97947.55	6	16324.59		
Total	6438961.05	8			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=320.08825

Error: 16324.5915 gl: 6

MUESTRA	Medias	n	E.E.	Letra
MIO MIO FRESCO	739.92	3	73.77	A
MIO MIO CONGELADO	1873.93	3	73.77	B
MIO MIO SECO	2792.19	3	73.77	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Se puede observar en este trabajo de investigación que la capacidad antioxidante TEAC ABTS aumenta en el extracto del mio mio seco y congelado con respecto al extracto de los frutos del mio mio fresco.

Reportaron resultados de capacidad antioxidante TEAC ABTS (E Marta Kuskoski et al., 2005) de mango en 67.6 (umol Trolox/g muestra fresca). En forma similar este autor (Eugenia Marta Kuskoski et al., 2006) determina en pulpa de frutos tropicales silvestres el contenido de capacidad antioxidante TEAC ABTS en solución metanólica del jambolao y baguazu determinando 21 y 83 (umol trolox/g en peso fresco), asimismo (Gaviria et al., 2009) han evaluado el TEAC – ABTS en mortiño y calcularon en 86.94 (umol Trolox/g muestra fresca).

Estudiaron la mora (*Rubus glaucus* Benth) y sus cambios en función de su maduración a diferentes temperaturas determinando su capacidad antioxidante TEAC ABTS de 117.83 (umol trolox/g en peso fresco) (León & Elisa, 2012), igualmente Hurtado et al., (2014) efectuaron estudios de capacidad antioxidante en extractos de cascara de capulí (*Prunus serotina* spp capulí), habiendo determinado su capacidad antioxidante de 499.3 (umol trolox/g en peso fresco), comparando de esta manera que el mio mio presenta una alta capacidad antioxidante TEAC – ABTS con 739.92 (umol trolox/g en peso fresco), de esta manera podría ser usado como una excelente materia prima para pigmentos antioxidantes naturales, del mismo modo (Beltrán-Orozco, Oliva-Coba, Gallardo-Velázquez, & Osorio-Revilla, 2009a) han determinado la capacidad antioxidante TEAC – ABTS en variedades de pitaya (*Stenocereus stellatus* R.) encontrando entre 11 y 17.3 (mmol/g), (Santacruz Cifuentes, 2011) investigaron la capacidad antioxidante TEAC ABTS en mora y motilón siendo de 0.223 y 0.426 (mmol trolox/g fruta) respectivamente al igual que Bermudez et al., (2016), también (Bermúdez et al., 2016) estudiaron la actividad antioxidante TEAC ABTS en extractos del exocarpo del corozo (*Bactris guineensis* L.) encontrando 0.12 (mmol Trolox/g de exocarpo de corozo).

Estudiaron 13 tipos de vinos peruanos elaborados en los departamentos de Ica y Lima (Muñoz Jáuregui, Fernández Giusti, Ramos Escudero, & Alvarado-Ortiz Ureta, 2007) y expresaron los resultados en TEAC (capacidad antioxidante trolox equivalente) encontrando entre 2,4 a 17,6 mM Trolox, en forma similar (Sousa, Vieira, & Lima, 2011) efectuaron investigaciones en acerola o cereza encontrando su capacidad antioxidante TEAC ABTS de 0.743 (mmol Trolox/g en pulpa fresca), presentando la capacidad antioxidante del mio mio de 0.74 (mmol trolox/g) dentro del rango de trabajos de investigación anteriormente estudiados y de forma muy similar a la cereza, lo cual

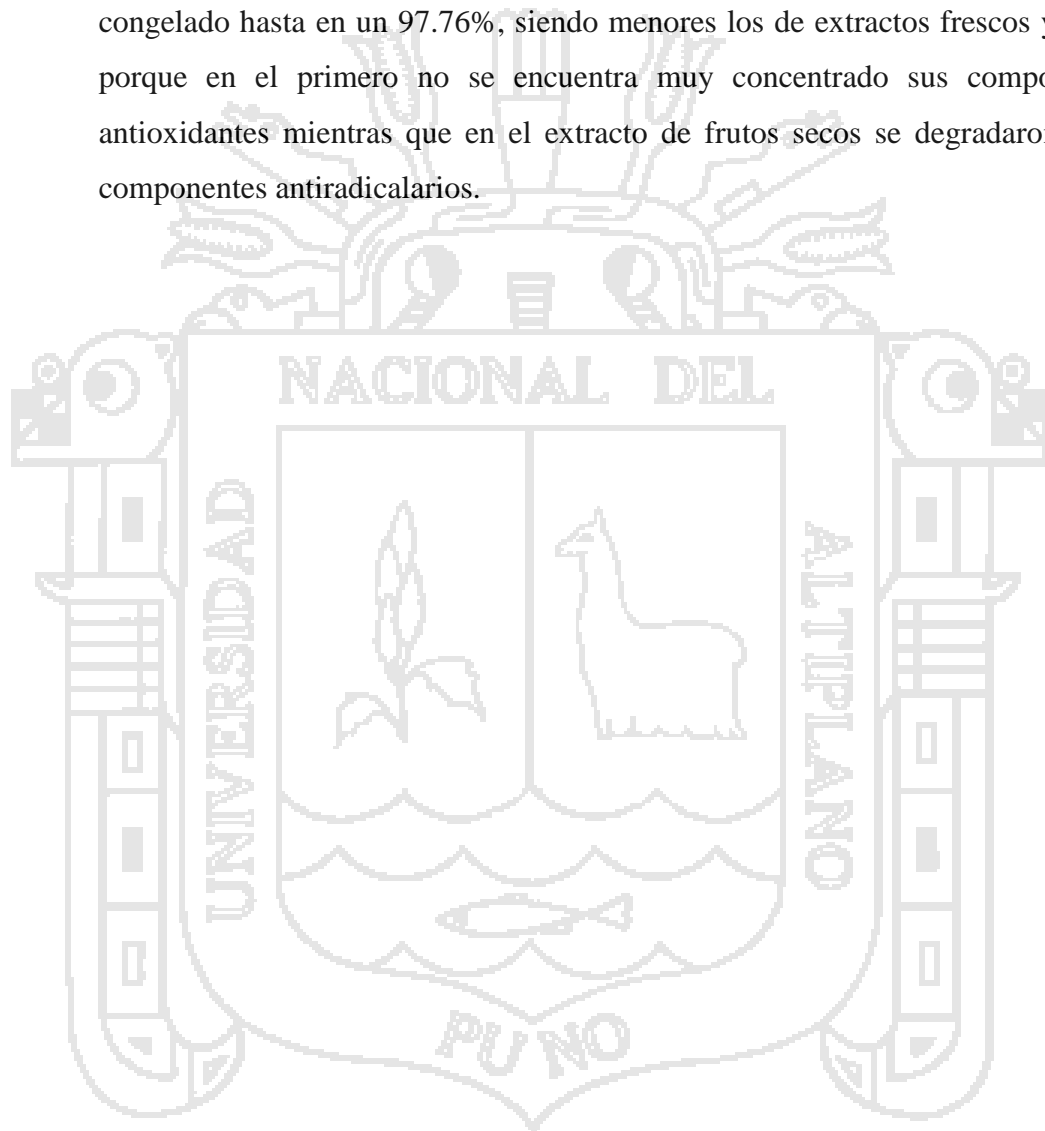
estaría confirmando que es una muy buena fuente de antioxidantes, asimismo (Reddivari, Hale, & Miller, 2007) analizaron la capacidad antioxidante TEAC – ABTS en papas de pulpas pigmentadas de Texas que oscilaron desde 157 a 832 ( $\mu\text{g}$  trolox/g peso fresco).

Estudiaron la capacidad antioxidante de frutas nativas (Repo de Carrasco & Encina Zelada, 2008) como en tuna roja y tomate de árbol determinando 651 y 838 (g trolox/g de tejido), siendo enmarcados dentro de estos parámetros los resultados de capacidad antioxidante de TEAC ABTS en extractos de mio mio que oscilan entre 185 a 698 (g trolox/g) a diferentes estados de conservación de esta materia prima, en forma similar (Rockenbach et al., 2011) evaluaron la capacidad antioxidante TEAC ABTS en orujos de uvas rojas de distintas variedades y hallaron que varían desde 193 a 485 ( $\mu\text{mol}$  TEAC/g de muestra seca) del mismo modo (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2007) en su trabajo metodología para evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas ha determinado la capacidad antioxidante TEAC ABTS en cascara de uva blanca y tinta, encontrando entre 227.9 y 355.4 ( $\mu\text{mol}$  TEAC/g de muestra seca) respectivamente, también (Li, Wang, Li, Li, & Wang, 2008) estudiaron la capacidad antioxidante TEAC ABTS en Uvas (*Vitis vinífera*), encontrando en sus extractos de solución metanólica 664.2 ( $\mu\text{mol}$  TEAC/g de muestra seca), siendo significativamente mayor la capacidad antioxidante del extracto de mio mio seco 2792 ( $\mu\text{mol}$  TEAC/g de muestra seca), lo cual demuestra su alta capacidad antioxidante concentrada una vez seca, lo cual depende del alto contenido de polifenoles totales que contiene.

## CONCLUSIONES

- Los extractos de los frutos del mio mio (*Coriaria ruscifolia* L) se ha caracterizado por espectrofotometría UV Visible encontrando la mayor absorbancia entre 520 a 545 nm de longitud de onda característica de las antocianinas, además por espectrometría FTIR – ATR los extractos de estos frutos presentaron vibraciones típicas de los grupos químicos que son típicas de las antocianinas, además se ha separado los componentes de este extracto por Cromatografía HPLC, encontrando entre sus componentes mayoritarios la cianidina como la antocianidina de mayor preponderancia, siendo este extracto entonces homogéneo en su composición.
- Se determinó el contenido de antocianinas totales CAT en los extractos del mio mio (*Coriaria ruscifolia* L), resultando 440.22 (mg cianidina 3-glucosido/100 g) en extracto fresco, aumentando a 1102.88 (mg cianidina 3-glucosido/100 g) en extracto congelado lo cual ocurre por la deshidratación que sufren estos frutos al someter al congelamiento, lo contrario ocurre con el extracto de frutos secos en la que disminuyen a 236.96 (mg cianidina 3-glucosido/100 g) con respecto al extracto fresco esto porque en el secado ocurre la senescencia en la que se degradan los compuestos antociánicos que dan el color rojo intenso en los frutos frescos del mio mio. Además se determinó el contenido de polifenoles totales PFT siendo 1820.41 (mg ácido gálico/100 g) en extracto de fruto fresco del mio mio, el mismo que se incrementó a 2317 y 5764 (mg ácido gálico/100 g) en extractos congelado y seco respectivamente, esto debido al grado de deshidratación que sufren en ambos casos.

- Con respecto a la capacidad antioxidante TEAC ABTS en los frutos del mio mio (*Coriaria ruscifolia* L) en extractos de frutos frescos resultó 739.92 (umol Trolox/g), el mismo que se incrementa a 1873 y 2792 (umol Trolox/g) en extractos congelados y secos respectivamente, lo cual se explica acorde al nivel de deshidratación en la que se encuentran ambos frutos, también se observó que el mayor % de inhibición al radical ABTS\* lo presenta el extracto del mio mio congelado hasta en un 97.76%, siendo menores los de extractos frescos y secos porque en el primero no se encuentra muy concentrado sus componentes antioxidantes mientras que en el extracto de frutos secos se degradaron estos componentes antiradicalarios.



## RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con el estudio de estos frutos del mio mio (*Coriaria ruscifolia* L.) a nivel de procesamiento industrial, para que tenga una mayor demanda y por consiguiente mayor producción que incrementa en el ingreso familiar de los pobladores de las zonas alto andinas que es de donde provienen estos frutos.
- Se sugiere trabajos de investigación que amplíen la información de sus compuestos bioactivos por ejemplo por RMN y lograr determinar su principio activo de estos extractos de frutos del mio mio
- Divulgar a la población a través de las entidades correspondientes de las propiedades funcionales que poseen estos frutos del mio mio.
- Evitar la luz durante la cuantificación de sus antioxidantes, ya que los reactivos utilizados en los métodos aplicados son fotosensibles.
- Emplear el presente estudio como guía base para determinaciones similares de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante en diversos alimentos de consumo y así investigar otros alimentos que contribuyen con el bienestar y fortalecimiento de la salud humana.
- Realizar estudios a largo plazo sobre la estabilidad de la capacidad antioxidante en alimentos funcionales
- Investigar el tipo específico de fenoles y flavonoides presentes en los frutos del mio mio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-López, J., Jaén-Jiménez, J. C., Vargas-Abarca, A. S., Jiménez-Bonilla, P., Vega-Guzmán, I., Herrera-Núñez, J., . . . Soto-Fallas, R. M. (2012). Extracción y evaluación de taninos condensados a partir de la corteza de once especies maderables de Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 25(4), 15-22.
- Aguilera-Otíz, M., del Carmen Reza-Vargas, M., Chew-Madinaveita, R. G., & Meza-Velázquez, J. A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *BIOtecnia*, 13(2), 16-22.
- Ah-Hen, K., Fuenzalida, C., Hess, S., Contreras, A., Vega-Gálvez, A., & Lemus-Mondaca, R. (2012). Antioxidant capacity and total phenolic compounds of twelve selected potato landrace clones grown in Southern Chile. *Chilean journal of agricultural research*, 72(1), 3.
- Amaya Rodríguez, L. M., & Portillo Membreño, C. E. (2013). *Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio Chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible*. Universidad de El Salvador.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), 7915-7922.
- Andersen, Ø. M., & Francis, G. W. (2004). 10 Techniques of pigment identification. *Plant Pigments and Their Manipulation*, 293.
- Andre, C. M., Ghislain, M., Bertin, P., Oufir, M., del Rosario Herrera, M., Hoffmann, L., . . . Evers, D. (2007). Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) as a source of antioxidant and mineral micronutrients. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(2), 366-378.



- Ángel, M. H., & González, E. A. P. (1999). Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. *Rev Cubana Invest Biomed*, 18(1), 12-14.
- Badui, S., Bourges-Rodriguez, H., & Anzaldúa-Morales, A. (1999). Proteínas. *Química de los alimentos. LONGMAN de México Editores, SA de CV*, 123-209.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
- Barragan Condori, M., & Aro Aro, J. M. (2017). Determinación del efecto de procesos de cocción en papas nativas pigmentadas (*Solanum tuberosum* spp. andigena) sobre sus compuestos bioactivos. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 19, 47-52.
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Fierro Morales, W., & Álvarez, A. (2006). Propóleos. Caracterización y normalización de propóleos argentinos. Revisión y actualización de composición y propiedades.
- Beltrán-Orozco, M. C., Oliva-Coba, T. G., Gallardo-Velázquez, T., & Osorio-Revilla, G. (2009a). Ácido ascórbico, contenido fenólico, y capacidad antioxidante de las variedades roja, cereza, amarilla y blanca del fruto del cactus de la pitaya (*Stenocereus stellatus* Riccobono). *Agrociencia*, 43(2), 153-162.
- Beltrán-Orozco, M. C., Oliva-Coba, T. G., Gallardo-Velázquez, T., & Osorio-Revilla, G. (2009b). Ascorbic acid, phenolic content, and antioxidant capacity of red, cherry, yellow and white types of pitaya cactus fruit (*Stenocereus stellatus* Riccobono). *Agrociencia*, 43(2).
- Bellatin, L., Herrera, O., Navarro, A., Sun-Kou, R., & Llanos, B. (2014). Estudio de la biosorción de Rojo ácido 18, Azul básico 99 y Amarillo básico 57, presentes en los tintes de cabellos, con residuos de hojas de té verde. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(1), 9-23.
- Bermúdez, M. F., Díaz-Moreno, C., & Fuenmayor, C. A. (2016). Evaluación de componentes antioxidantes de extractos etanólicos del exocarpo del corozo (*Bactris guineensis* L.). *Agronomía Colombiana*, 34(1Supl), S1474-S1478.
- Bridle, P., & Timberlake, C. (1997). Anthocyanins as natural food colours—selected aspects. *Food chemistry*, 58(1), 103-109.

- Brown, C. (2005). Antioxidants in potato. *American Journal of potato research*, 82(2), 163-172.
- Burton, W. (1989). The potato. *Longmann, New York*.
- Butkhup, L., & Samappito, S. (2008). Analysis of anthocyanin, flavonoids, and phenolic acids in tropical bignay berries. *International Journal of Fruit Science*, 8(1-2), 15-34.
- Cajías, M., & Fernandez, B. (1987). *Manual de tintes naturales*: SEMTA, Servicios Múltiples de Tecnologías Apropriadas.
- Calderón de Rzedowski, G. (1992). CORIARIACEAE: Fascículo 5;.
- Carvajal de Pabón, L. M., Turbay, S., Rojano, B., Álvarez, L. M., Luz Restrepo, S., Álvarez, J. M., . . . Sánchez, N. (2011). Algunas especies de Passiflora y su capacidad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(4), 354-363.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. d. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>
- Castillo, G., Michelena, G., Nogueiras, C., Ortega, G., Bello, D., Guerra, M., . . . Mieres, G. (2010). Caracterización cromatográfica y espectroscópica de un pigmento rojo obtenido a partir de *Bothryodiplodia theobromae*.
- Cevallos-Casals, B. A., & Cisneros-Zevallos, L. (2004). Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chemistry*, 86(1), 69-77.
- Clark, N. (2013). *Nancy Clark's Sports Nutrition Guidebook, 5E*: Human Kinetics.
- Collado González, J. (2011). Identificación de los polifenoles en zumos de frutas rojas.
- Condori, M. B., & Aro, J. M. A. (2017). DETERMINACION DEL EFECTO DE PROCESOS DE COCCION EN PAPAS NATIVAS PIGMENTADAS (*Solanum tuberosum* spp. andigena) SOBRE SUS COMPUESTOS BIOACTIVOS. *Revista de Investigaciones Altoandinas-Journal of High Andean Research*, 19(1), 47-52.
- Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos, un análisis de sus beneficios para la salud. *Ámbito farmacéutico*, 23, 80-84.
- Chacón, L., & Octavio, S. (2015). Plantas tintóreas utilizadas en el teñido de textiles artesanales en el Perú.

- da Costa, C. T., Horton, D., & Margolis, S. A. (2000). Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 881(1), 403-410.
- Dabrio, M. V., Blanch, G. P., & Matas, M. G. (1999). *Cromatografía y electroforesis en columna*: Springer-Verlag Ibérica.
- Daniel, D. Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora. *Huajuapán de León, Oaxaca, México: Universidad Tecnológica de la Mixteca*.
- de Mayolo, K. K. A. (1989). Peruvian natural dye plants. *Economic botany*, 43(2), 181-191.
- de Ugaz, O. L. (1994). *Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda Edición*: Univ Católica Peru.
- Del Carpio, C. Caracterización De Las Antocianinas De Los Frutos De Lechler. *Food Science & Technology Department, The Ohio State University*, 110, 43210-41007.
- Del Carpio Jiménez, C., Serrano Flores, C., & Giusti, M. (2009). Caracterización de las antocianinas de los frutos de Berberis boliviana Lechler. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 75(1), 76-86.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40(3), 173-289.
- Delgado-Vargas, F., & Paredes-López, O. (2002). *Natural colorants for food and nutraceutical uses*: CRC Press.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2011). InfoStat.
- Díaz García, M. C. (2012). Perfil de compuestos funcionales en zumos de frutas rojas.
- Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2001). Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC *Current protocols in food analytical chemistry*: John Wiley & Sons, Inc.
- Eder, R., Wendelin, S., & Barna, J. (1994). Klassifizierung von Rotweinsorten mittels Anthocyananalyse. I: Anwendung multivariater statistischer Methoden zur

- Differenzierung von Traubenproben. *Mitteilungen Klosterneuburg Rebe und Wein, Obstbau und Früchteverwertung*, 44(6), 201-212.
- Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2004). Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A*, 1054(1), 129-141.
- Ezekiel, R., Singh, N., Sharma, S., & Kaur, A. (2013). Beneficial phytochemicals in potato—a review. *Food Research International*, 50(2), 487-496.
- Fan-Chiang, H. J., & Wrolstad, R. E. (2005). Anthocyanin pigment composition of blackberries. *Journal of Food Science*, 70(3).
- Fennema, O. (2000). Química de los alimentos. Acribia. Zaragoza, España, 433-469.
- Fernández Pinto, J. V. (2011). *BARRIDO SISTEMÁTICO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL Y EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS (FLAVONOIDEOS Y FENOLES TOTALES) DE ALIMENTOS VEGETALES. DEL DEPARTAMENTO DE LAPAZ.*
- FLAX, D. O. (2006). FTIR Spectroscopy. *STUDIES IN CONSERVATION*, 51, 205-211.
- García Pastor, M. E. (2016). Contenido en antocianos y compuestos fenólicos en diferentes frutos frescos y deshidratados.
- GARZÓN, G. A. (2008a). LAS ANTOCIANINAS COMO COLORANTES NATURALES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS: REVISIÓN. *Acta Biológica Colombiana*, 13, 27-36.
- Garzón, G. A. (2008b). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3), 27-36.
- Gaviria, C. A., Ochoa, C. I., Sánchez, N., Medina, C., Lobo, M., Galeano, P. L., . . . Rojano, B. (2009). Propiedades antioxidantes de los frutos de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale Swartz*). *Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño en la zona altoandina de Colombia. Colombia: Universidad Nacional de Colombia*, 95-112.
- GIUSTI, M. M., & WROLSTAD, R. E. (1996). Characterization of red radish anthocyanins. *Journal of food science*, 61(2), 322-326.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*.

- Gozzi, I. M. S. (2011). VARIABILIDAD DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS FOLIARES DE ARÁNDANO VACCINIUM ASHEI OBTENIDOS EN DIFERENTES CONDICIONES DE EXTRACCIÓN.
- Gross, J., & Gross, J. (1987). *Pigments in fruits*: Academic Press London.
- Guédès, M. (1971). Carpel Peltation and Syncarpy in *Coriaria ruscifolia* L. *New phytologist*, 70(1), 213-227.
- Guerra, M., & Ortega, G. (2006). Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químico-físicos. Parte I.
- Guerrero Cáceres, C. A. (2012). *Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante en fibra dietética extraída de cultivos ancestrales andinos para su utilización como suplemento alimenticio*.
- Guerrero, J., Ciampi, L., Castilla, A., Medel, F., Schalchli, H., Hormazabal, E., . . . Alberdi, M. (2010). Antioxidant capacity, anthocyanins, and total phenols of wild and cultivated berries in Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(4), 537-544.
- Gutiérrez, I. H., García-Romero, E., & de Calatrava, R. (2004). Antociano de variedades tintas cultivadas en La Mancha; perfiles varietales característicos de la uva y de los vinos monovarietales, y evolución durante la maduración de la baya. *Alimentaria*, 127-140.
- Halbwirth, H. (2010). The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *International journal of molecular sciences*, 11(2), 595-621.
- Halliwell, B. (1996). Commentary oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free radical research*, 25(1), 57-74.
- Harborne, J. (1958). Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochemical Journal*, 70(1), 22.
- Harborne, J. B., & Williams, C. (1998). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural product reports*, 15(6), 631-652.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2001). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural product reports*, 18(3), 310-333.

- Haytowitz, D. B., & Bhagwat, S. (2010). USDA database for the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods, Release 2. *US Department of Agriculture*, 10-48.
- Héctor, A. L., Clavijo, C., & Herrera, C. (2006). Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivados en Chile. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56(4), 361.
- Hernández Domínguez, S. V. (2012). Relación entre la capacidad antioxidante y composición fenólica en vinos tintos del cv. carmenere.
- Hurtado, N. H., & Pérez, M. (2014). Identificación, estabilidad y actividad antioxidante de las antocianinas aisladas de la cáscara del fruto de capulí (*Prunus serotina* spp capuli (Cav) Mc. Vaug Cav). *Información tecnológica*, 25(4), 131-140.
- Kalt, W., Lawand, C., Ryan, D. A., McDonald, J. E., Donner, H., & Forney, C. F. (2003). Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during ripening and storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128(6), 917-923.
- Kechinski, C. P., Guimarães, P. V. R., Noreña, C. P. Z., Tessaro, I. C., & Marczak, L. D. F. (2010). Degradation kinetics of anthocyanin in blueberry juice during thermal treatment. *Journal of food science*, 75(2), C173-C176.
- Kopjar, M., Piližota, V., Šubarić, D., & Babić, J. (2009). Prevention of thermal degradation of red currant juice anthocyanins by phenolic compounds addition. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 1(1), 24-30.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García-Parilla, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianínicos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 24(4), 691-693.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Morales, M. T., & Fett, R. (2006). Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. *Ciência Rural*, 36(4), 1283-1287.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology (Campinas)*, 25(4), 726-732.
- Lechler, D. (2009). CARACTERIZACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS DE LOS FRUTOS. *Rev Soc Quím Perú*, 75, 1.

- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC international*, 88(5), 1269-1278.
- León, S., & Elisa, D. (2012). *Estudio del potencial antioxidante de la mora (Rubus glaucus Benth) y sus cambios en función del proceso de maduración y bajo diferentes temperaturas de almacenamiento*. Universidad Nacional de Colombia.
- Lewis, C. E., Walker, J. R. L., & Lancaster, J. E. (1995). Effect of polysaccharides on the colour of anthocyanins. *Food Chemistry*, 54(3), 315-319. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00026-F](http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(95)00026-F)
- Li, H., Wang, X., Li, P., Li, Y., & Wang, H. (2008). Comparative study of antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) seed powder assessed by different methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(6).
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of nutrition*, 134(12), 3479S-3485S.
- Lock Sing de Ugaz, O. (1997). Colorantes naturales.
- Londoño Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad *Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia: Corporación Universitaria Lasallista*.
- Macedo-Márquez, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 15(2), 97-103.
- Mariella, P., & Anita, I. (2011). Papel de la angiotensina II en la resistencia a la insulina neuronal en un modelo experimental de diabetes tipo 2 en ratas. *Diabetes Internacional*, 3(4), 88.
- Markakis, P. (1982). Stability of anthocyanins in foods. *Anthocyanins as food colors*, 163-180.
- Márquez Mendoza, G. d. C. (2011). Capacidad antioxidante y caracterización estructural de las antocianinas de los frutos rojos de *Prunus domestica* L., *Ficus carica* L. y *Vitis vinifera* L. cv" red globe" cultivados en Perú.
- Martínez-Cruz, N. d. S., Arévalo-Niño, K., Verde-Star, M. J., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A., Núñez-González, M., & Morales-Rubio, M. (2011).

- Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl (zarzamora). *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 42(4), 66-71.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, 17(6), 271-278.
- Martínez, A. (2005). Flavonoides: Tesina. Facultad de Química Farmacéutica. *Flavonoides: Tesina. Facultad de Química Farmacéutica*.
- Martínez, E. G., Segovia, I. F., & López, A. F. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.
- Martínez García, C. A. (2014). *Identificación de flavonoides con actividad antioxidante presentes en Alchornea coelophylla (Euphorbiaceae)*. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira.
- Marx, R., Holbach, B., & Otteneder, H. (2000). Determination of nine characteristics anthocyanins in wine by HPLC. *Off. Int. Vigne Vin. Bulletin*.
- McDonough, C. M., Rooney, L. W., & Serna-Saldivar, S. O. (2000). The millets. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 177-202.
- Merken, H. M., & Beecher, G. R. (2000). Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 577-599.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science (London, England: 1979)*, 84(4), 407-412.
- Miquel, J., & Ramírez-Boscá, A. (2004). Estrés oxidativo y suplementación antioxidante de la dieta en el envejecimiento, la aterosclerosis y la disfunción inmunitaria.
- Muñoz, C., Maihua, R., Peralta, F., Tereschuk, M., Gonzales, M., & Albarracin, P. (2008). Análisis de antocianinas en arándanos del Noa. *Universidad Nacional de Tucumán. Departamento de Ingeniería de Procesos y Gestión Industrial. Argentina*.
- Muñoz Jáuregui, A. M., Fernández Giusti, A., Ramos Escudero, F., & Alvarado-Ortiz Ureta, C. (2007). Evaluación de la actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en vinos producidos en Perú. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73(1), 30-40.



- Muñoz, M. (2014). Revista agrícola octubre Retrieved 6 de octubre, 2016, from [http://www.inia.cl/wp-content/uploads/2014/09/revista\\_agricola\\_octubre\\_36-37.pdf](http://www.inia.cl/wp-content/uploads/2014/09/revista_agricola_octubre_36-37.pdf)
- Naqui, A., Chance, B., & Cadenas, E. (1986). Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annual review of biochemistry*, 55(1), 137-166.
- Neida, S., & Elba, S. (2007). Caracterización del acai o manaca (Euterpe olerácea Mart.): un fruto del Amazonas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(1), 94.
- Noriega Rivera, P., Coba Santamaría, P., Naikiai, J., & Abad, J. (2011). Extracción, pruebas de estabilidad y análisis químico preliminar de la fracción colorante obtenida a partir del exocarpo del fruto de Renealmia Alpina.
- OLIVEIRA, A. C. d., VALENTIM, I. B., GOULART, M. O. F., SILVA, C. A., BECHARA, E. J. H., & TREVISAN, M. T. S. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32(3), 689-702.
- Oliveira, S. d., Souza, G. A. d., Eckert, C. R., Silva, T. A., Sobral, E. S., Fávero, O. A., . . . Baader, W. J. (2014). Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*, 37(3), 497-503.
- Olmedo, R. H., Asensio, C., Nepote, V., Mestrallet, M. G., & Grosso, N. R. (2009). Chemical and sensory stability of fried-salted peanuts flavored with oregano essential oil and olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(12), 2128-2136.
- Ortega, V. (2004). *Estudio Comparativo en el uso de colorantes naturales y sintéticos en alimentos, desde el punto de vista funcional y toxicológico*. Tesis]. Chile: Ingeniería de alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile.
- Osman, A., Wong, K., & Fernyhough, A. (2006). ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochemical and biophysical research communications*, 346(1), 321-329.
- Paredes, V. R. V. Composición química cotiledonar en nueces de nueve clones de Gevuin (Gevuina avellana Mol.).
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. A. (2008). *Introduction to spectroscopy*: Cengage Learning.

- Pérez-Jiménez, J., & Saura-Calixto, F. (2007). *Metodología para la evaluación de capacidad antioxidante en frutas y hortalizas*. Paper presented at the V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones. Cartagena.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2005). Antioxidantes de los alimentos. *Editorial Acribia, SA Zaragoza. España*.
- Porras-Loaiza, A., & López-Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 121-124.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27, 76-89.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Reddivari, L., Hale, A. L., & Miller, J. C. (2007). Determination of phenolic content, composition and their contribution to antioxidant activity in specialty potato selections. *American Journal of Potato Research*, 84(4), 275-282.
- Rein, M. (2005a). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins.
- Rein, M. (2005b). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins: University of Helsinki Helsinki.
- Repo de Carrasco, R., & Encina Zelada, C. R. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 74, 108-124.
- Reyes, L., Miller, J., & Cisneros-Zevallos, L. (2004). Environmental conditions influence the content and yield of anthocyanins and total phenolics in purple-and red-flesh potatoes during tuber development. *American Journal of potato research*, 81(3), 187-193.
- Ribera, A., Reyes-Diaz, M., Alberdi, M., Zuñiga, G., & Mora, M. (2010). Antioxidant compounds in skin and pulp of fruits change among genotypes and maturity stages in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in Southern Chile. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(4), 509-536.

- Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliari, V., Genovese, M. I., Gonçalves, A. E. d. S. S., & Fett, R. (2011). Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food chemistry*, 127(1), 174-179.
- Rodríguez, E. F. R., Sevilla, S. R., Pizarro, Y. P., Cayatopa, V. R., Velásquez, L. P., Espejo, M. R. R., & Tocas, R. A. (2017). Vegetales tintóreos promisorios más utilizados en la región La Libertad, Perú. *ARNALDOA*, 24(1), 311-332.
- San Martín, Á. J., Villanueva, E., Tito Cruz, A., Flores, D., Gomez, R. D., Almanza, G. R., & Flores, Y. R. (2012). Estudio fitoquímico y espectroscópico preliminar de cinco plantas medicinales de Carmen Pampa (Coroico) Bolivia. *Revista Boliviana de Química*, 29(2), 121-129.
- Santa Cruz Cervera, L. (2011). Flora de espermatofitas del distrito de Pulán, Santa Cruz-Cajamarca.
- Santacruz Cifuentes, L. A. (2011). *Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos*. Universidad Nacional de Colombia.
- Seeram, N. P. (2008a). Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 630-635.
- Seeram, N. P. (2008b). Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease: ACS Publications.
- Shalisko, V., González-Villarreal, L. M., & Carvajal, S. (2007). *La familia Coriariaceae en el estado de Jalisco, México*: Universidad de Guadalajara.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, 82(2), 291-295.
- Singleton, V., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
- Skoog, D. A., Holler, F., & Timothy, A. D. A. (2001). *Principios de análisis instrumental*: McGraw-Hill Interamericana de España.

- Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., & Gómez, M. d. C. M. (2001). Principios de análisis instrumental.
- SOLEDAD FERNANDEZ-PACHON, M., VILLAFIO, D., TRONCOSO, A. M., & García-Parrilla, M. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 56(2), 110-122.
- Sousa, M., Vieira, L., & Lima, A. (2011). Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. *Brazilian Journal of Food Technology, Campinas*, 14(3), 202-210.
- Stintzing, F. C., Stintzing, A. S., Carle, R., Frei, B., & Wrolstad, R. E. (2002). Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 6172-6181.
- Timberlake, C. F. (1980). Anthocyanins—Occurrence, extraction and chemistry. *Food Chemistry*, 5(1), 69-80. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(80\)90065-5](http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(80)90065-5)
- Torres, R., Montero, G., Jaramillo, B., Beleño, M., Pérez, L., Romero, E., . . . Coronado, M. (2015). DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO ENERGÉTICO DE LIGNINA OBTENIDA A PARTIR DE VARA DE ALGODÓN DEL VALLE DE MEXICALI, MÉXICO.
- van der Sluis, A. A., Dekker, M., de Jager, A., & Jongen, W. M. (2001). Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3606-3613.
- Vargas Simón, G., Soto Hernández, R. M., & Rodríguez González, M. T. (2002). Análisis preliminar de antocianinas en fruto de icaco (*Chrysobalanus icaco* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 25(3).
- Vasco, C., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food chemistry*, 111(4), 816-823.
- Wade, L. G., Pedrero, Á. M., & García, C. B. (2004). *Química orgánica*: Pearson prentice hall España.
- Walford, J. (1980). Historical development of food coloration. *Developments in food colours*, 1, 1-25.

- Wang, S. Y., & Lin, H.-S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 140-146.
- Wong, D. W. (1994). *Química de los alimentos: mecanismos y teoría*: Acribia.
- Wrolstad, R. E. (2000). *Anthocyanins*. Paper presented at the IFT BASIC SYMPOSIUM SERIES.
- Wrolstad, R. E., & Heatherbell, D. A. (1974). Identification of anthocyanins and distribution of flavonoids in tamarillo fruit (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25(10), 1221-1228.
- ZAPATA, L. (2014). *OBTENCIÓN DE EXTRACTO DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE ARÁNDANOS PARA SER UTILIZADO COMO ANTIOXIDANTE Y COLORANTE EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA*.
- Zapata, L. M., Heredia, A. M., Quinteros, C. F., Malleret, A. D., Clemente, G., & Cárcel, J. A. (2014). Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. *Ciencia, docencia y tecnología*(49), 166-192.
- Zhao, Y. (2007). *Berry fruit: value-added products for health promotion*: CRC press.
- Zorrilla García, A. E. (2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21(3), 178-185.

**ANEXOS**



**Anexo 1.** Frutos del mio mio (*Coriaria ruscifolia* L.) fresco.



**Anexo 2.** Extracción y filtración de pigmentos antociánicos de muestras de frutos de mio mio.

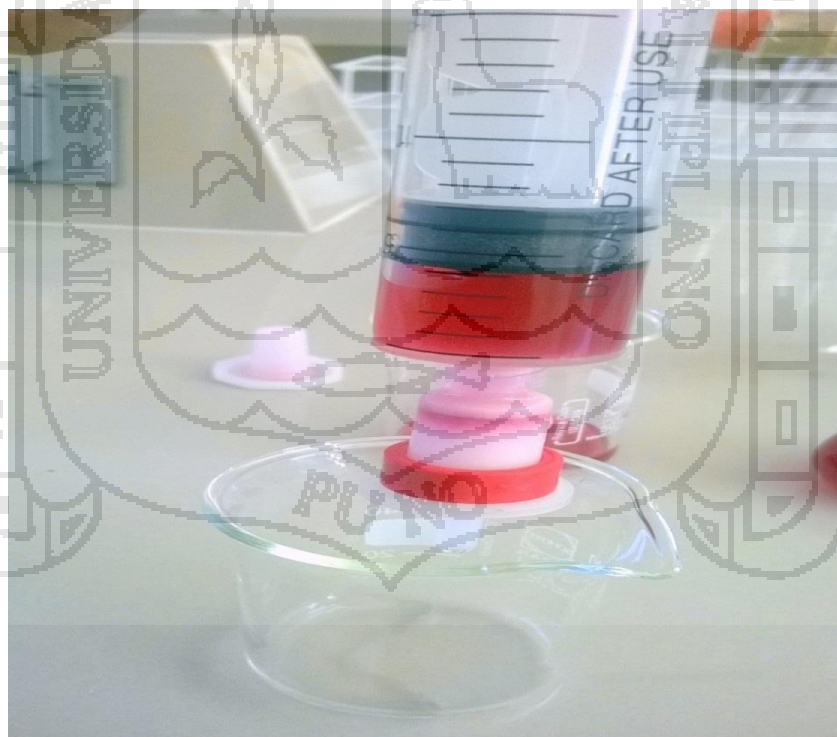




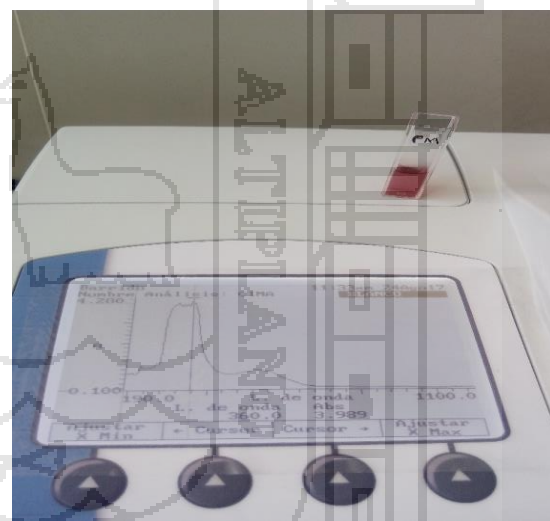
**Anexo 3.** Extracción de pigmentos antociánicos de muestras de frutos de mio mio en equipo rotavapor a presión reducida.



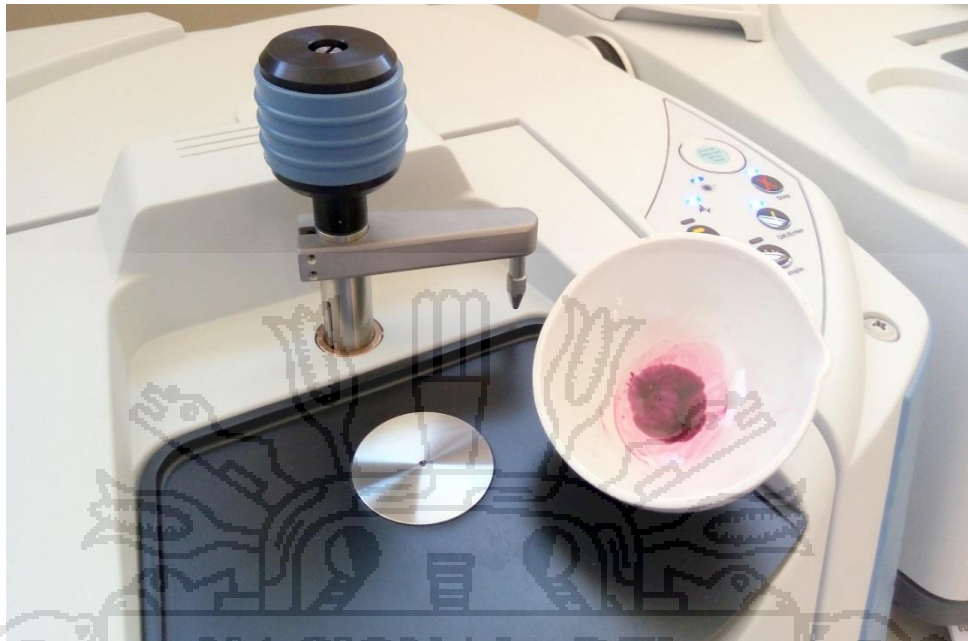
**Anexo 4.** Hidrólisis ácida y purificación de extractos de antocianinas con C-18.



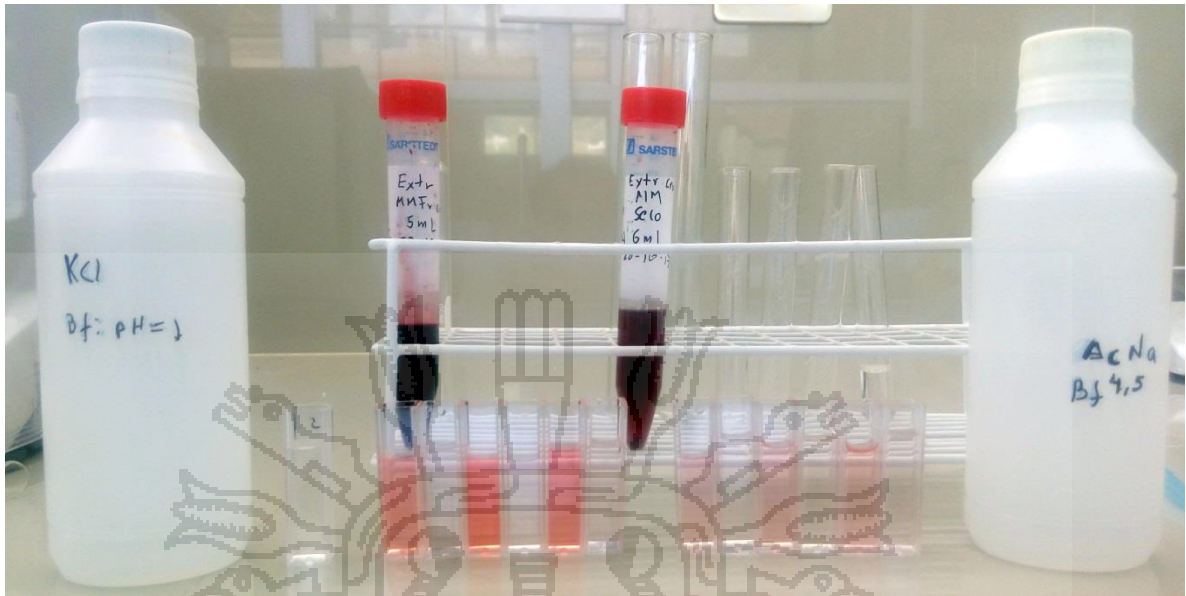
**Anexo 5.** Espectrofotometría UV – Visible de antocianinas para caracterizar antocianinas.



Anexo 6. Espectrómetro FTIR – ATR de antocianinas



**Anexo 7.** Contenido de antocianinas Totales CAT por método pH diferencial.



Anexo 8. Contenido de Polifenoles Totales PFT (Método Folin Ciocalteu).



Anexo 9. Capacidad antioxidante TEAC – ABTS\*



Anexo 9. Tabla de frecuencias de vibración FTIR

Type of Vibration			Frequency (cm <sup>-1</sup> )	Intensity	Page Reference	
C-H	Alkanes	(stretch)	3000-2850	s	29	
	-CH <sub>3</sub>	(bend)	1450 and 1375	m		
	-CH <sub>2</sub> -	(bend)	1465	m		
	Alkenes	(stretch)	3100-3000	m	31	
		(out-of-plane bend)	1000-650	s		
	Aromatics	(stretch)	3150-3050	s	41	
		(out-of-plane bend)	900-690	s		
Alkyne	(stretch)	ca. 3300	s	33		
Aldehyde			2900-2800	w	54	
			2800-2700	w		
C-C	Alkane		Not interpretatively useful			
C=C	Alkene		1680-1600	m-w	31	
	Aromatic		1600 and 1475	m-w	41	
C=C	Alkyne		2250-2100	m-w	33	
C=O	Aldehyde		1740-1720	s	54	
	Ketone		1725-1705	s	56	
	Carboxylic acid		1725-1700	s	60	
	Ester		1750-1730	s	62	
	Amide		1680-1630	s	68	
	Anhydride		1810 and 1760	s	71	
	Acid chloride		1800	s	70	
	C-O	Alcohols, ethers, esters, carboxylic acids, anhydrides		1300-1000	s	45, 48, 60, 62, and 71
O-H	Alcohols, phenols					
	Free		3650-3600	m	47	
	H-bonded		3400-3200	m	47	
	Carboxylic acids		3400-2400	m	61	
N-H	Primary and secondary amines and amides					
	(stretch)		3500-3100	m	72	
	(bend)		1640-1550	m-s	72	
C-N	Amines		1350-1000	m-s	72	
C=N	Imines and oximes		1690-1640	w-s	75	
C≡N	Nitriles		2260-2240	m	75	
X-C-Y	Allenes, ketenes, isocyanates, isothiocyanates		2270-1940	m-s	75	
N-O	Nitro (R-NO <sub>2</sub> )		1550 and 1350	s	77	
S-H	Mercaptans		2550	w	79	
S-O	Sulfoxides		1050	s	79	
	Sulfones, sulfonyl chlorides, sulfates, sulfonamides		1375-1300 and 1350-1140	s	80	
C-X	Fluoride		1400-1000	s	83	
	Chloride		785-540	s	83	
	Bromide, iodide		<667	s	83	