

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias e Ingenierías**

**Extracción y Cuantificación de Antocianinas por Método de pH  
Diferencial**

**Yevgeniya Maltabar**

**Ingeniería Química**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniera Química

Quito, 28 de abril de 2020

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias e Ingenierías**

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Extracción y Cuantificación de Antocianinas por Método de pH  
Diferencial**

**Yevgeniya Maltabar**

**Nombre del profesor, Título académico**

**David Egas, PhD.**

Quito, 28 de abril de 2020

## **DERECHOS DE AUTOR**

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Yevgeniya Maltabar

Código: 00131087

Cédula de identidad: 1719400549

Lugar y fecha: Quito, abril de 2020

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## RESUMEN

Dada la problemática de pigmentos sintéticos dentro de la industria alimenticia por sus potenciales perjuicios para la salud, se considera las antocianinas como una alternativa para pigmentos. Se describe el procedimiento de extracción del pigmento, la preparación de las soluciones correspondientes para el análisis, el procedimiento para la cuantificación por método de pH diferencial con un espectrómetro UV-VIS Cecil CE 2041. La harina de maíz morado (*Zea mays*), mortiño (*Vaccinium meridionale*) e hibisco (*Hibiscus*) son las muestras con mayor concentración de antocianinas que podrían representar una potencial fuente de pigmentos.

Palabras clave: antocianinas, pH, extracción, flavonoides, colorantes

## ABSTRACT

Given the problem of synthetic pigments in food industry due to potential harmful effects to health, anthocyanins are considered as an alternative for pigments. The procedure for extracting the pigment is described, as the preparation of solutions for the analysis and the procedure for the quantification by the method of differential pH using a UV-VIS Cecil CE 2041 spectrometer. Purple corn flour (*Zea mays*), mortiño (*Vaccinium meridionale*), and hibisco (*Hibiscus*) are the samples which showed the highest concentrations of anthocyanins; hence, these may represent potential sources of pigments.

Key words: anthocyanins, pH, extraction, flavonoids, colorant

**TABLA DE CONTENIDO**

Introducción.....	8
Metodología.....	10
Resultados.....	13
Discusión .....	14
Conclusiones .....	18
Referencias bibliográficas.....	19

## INTRODUCCIÓN

Las antocianinas también conocidas como flavonoides son un grupo de compuestos fenólicos presentes en hojas, frutos, tallos y, en ocasiones, raíces que actúa como pigmento en las plantas (Ramírez, 2007). Estos se pueden encontrar en forma de glucósidos, es decir, la molécula está anexada a un azúcar (Tsuda, 2011). Son responsables del color rojo, rosado, naranja, violeta y azul en algunas frutas y verduras (Kechinski et al, 2010). Algunos de los compuestos más comunes bajo esta denominación son cianidina, delphinina, malvidina, pelargonidina, petunidina que difieren en algunos grupos funcionales (Jaakola, 2013). La genética de la planta determina qué tipo específico de antocianina ésta producirá, no obstante, su concentración se ve afectada por factores ambientales (Jaakola, 2013). Tsuda reporta que la saturación de color de una antocianina incrementa al añadir grupos hidroxilo y disminuye con grupos metoxi (2011). La variación de colores se puede explicar principalmente por la variación en pH, ya que, bajo condiciones ácidas se obtiene el ion flavilio con una coloración roja con una estructura estable (Tsuda, 2011). Por el contrario, bajo condiciones básicas tienden a perder su coloración, al igual que su estabilidad.

La coloración dada por las antocianinas es dependiente de una serie de factores como: pH, exposición a la luz, oxígeno, enzimas, iones metálicos, copigmentación, entre otros (Kechinski et al, 2010). Se sabe que estos compuestos son indicadores de la madurez de un fruto, ya que es acumulado únicamente durante la etapa de maduración (Jaakola, 2013). Una de las propiedades fundamentales es su naturaleza polar, lo que hace las antocianinas hidrosolubles. Esto contribuye a que es procesado de forma fácil con solventes comunes como el metanol, etanol, acetona y agua (Denev, 2010).

Las antocianinas proveen de una serie de beneficios dentro de la dieta humana gracias a sus propiedades antioxidantes. Esto contribuye a la prevención de enfermedades

cardiovasculares y neuronales, cáncer, diabetes (Kechinski et al, 2010). Además, estos compuestos se usan para el tratamiento del glaucoma y otras perturbaciones de la vista (Denev, 2010).

Dentro de la industria se utilizan ampliamente colorantes y pigmentos que, generalmente, son de origen sintético (DelCarpio, s/f). No obstante, en la industria alimenticia existen ciertas restricciones sanitarias respecto a su aplicación por dudas sobre sus efectos en la salud (Ramírez, 2007). Un ejemplo de estos pigmentos son los Azo que son compuestos sintéticos que también son parte de contaminantes ambientales (Gao, 2008). Estos se aplican de forma efectiva como colorantes alimenticios, cosméticos e incluso tintes biológicos. No obstante, se conoce que, al penetrar en el cuerpo, estos pueden ser procesados por las azo reductasas que generan aminas aromáticas que pueden ser carcinógenas (Gao, 2008).

Por ende, las antocianinas pueden representar una alternativa a esta problemática además de poseer un valor agregado (antioxidantes) que es relevante para la industria alimenticia (Ramírez, 2007). Además, considerando las tendencias actuales de consumo de productos orgánicos y rechazo hacia lo sintético, sería atractivo para los consumidores. Adicionalmente, se podría contribuir a la reducción del problema de desperdicio de alimentos. De Brasil se exportan una cantidad de bayas, no obstante, aproximadamente el 30% de las mismas son rechazadas dadas las dificultades de post cosecha y almacenamiento al ser un fruto que sostiene daños de forma relativamente fácil. (Kechinski et al, 2010). Estos restos se podrían emplear en la industria de los pigmentos, reducir pérdidas económicas y desperdicio. Adicionalmente, considerando la diversidad en flora y fauna dentro del Ecuador, hay muestras que pueden tener un gran potencial y contribuir a las actividades artesanales regionales que impliquen el uso de pigmentos.

A continuación, se describe el procedimiento empleado para la extracción y análisis de las muestras correspondientes.

## METODOLOGÍA

### - Preparación de Muestras

Se lavó y cortó los especímenes para eliminar impurezas. Posteriormente, se realizó el secado de las muestras por 24 horas a 65 °C en un horno. Esto contribuye a igualar los niveles de agua y evitar errores por dilución de las antocianinas.

### - Extracción

Una vez obtenida la muestra seca, se pesó 3 gramos de cada espécimen y se colocó 25 mL de alcohol etílico. Se cerró el envase con papel aluminio por la parte superior y los lados para evitar evaporación del alcohol y degradación por la incidencia de la luz. El recipiente con la muestra y el alcohol etílico se colocó en agitación continua por 72 horas. Posteriormente, se perforaron pequeños orificios para permitir la evaporación del etanol. Una vez seca la muestra, se colocaron 20 mL de agua destilada y se trató con ultrasonido por 10 minutos. Esto promovió la extracción de antocianinas mediante la rotura de la estructura vegetal permitiendo su liberación. El líquido resultante fue extraído y separado del residuo sólido por centrifugado de 10 minutos a 4000 rpm.

### - Preparación de soluciones buffer

Se realizaron dos soluciones buffer en base al método de pH diferencial para la determinación del contenido total de antocianinas monoméricas de AOAC.

- a) Buffer cloruro de potasio a pH 1 (0.025 M): Se pesó 1.86 gramos de cloruro de potasio y se colocó en un balón de aforo. Se añadió agua destilada hasta 900 mL y se ajustó el pH con ácido clorhídrico 0.5 M hasta pH 1 ( $\pm 0.05$ ). Una vez alcanzado el pH deseado, se aforó hasta 1 L con agua destilada.

- b) Buffer de acetato de sodio a pH 4.5 (0.4 M): Se pesó 54.43 g de acetato de sodio y se colocó en un balón de aforo con 500 mL de agua. Se añadió ácido clorhídrico 0.5 M hasta alcanzar un pH 4.5 ( $\pm 0.05$ ). Posteriormente, se aforó la solución a 1 L con agua destilada
- Preparación de soluciones de muestra

Se realizaron diluciones con un máximo de 1:4 en proporción muestra:buffer. El factor de dilución se determina en base al rango lineal del espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm. El rango tolerable de absorbancia se estableció entre 0.0 y 2.0. Empleando el factor de dilución adecuado se prepararon muestras con cada uno de los buffers, es decir, a pH 1 y pH 4.5.

- Medición de antocianinas

Para establecer la línea base y corregir errores por imperfecciones de la celda, se analizó un blanco con agua destilada en un rango de 400 a 700 nm en un espectrómetro UV-VIS Cecil CE 2041. Posteriormente, se tomaron las muestras preparadas en el punto anterior y se analizaron en una celda de cuarzo de longitud de camino de 10 mm en el rango antes mencionado. El ensayo se realizó con las muestras tanto a pH 1 como a pH 4.5 con interés en longitudes de onda de 520 y 700 nm.

- Cálculo del contenido total de antocianinas monoméricas

Los resultados se reportan como equivalentes de cianidina-3-glucósido de la siguiente manera:

$$\text{Pigmento antocianina (equivalente de cianidina - 3 - glucosido, } \frac{\text{mg}}{\text{L}}) = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l}$$

En donde:

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

$$MW (\text{masa molar}) = 449.2 \frac{\text{g}}{\text{mol}} (\text{cyd} - 3 - \text{glu})$$

**DF** = *Factor de dilución*

**1** = *Espesor de celda en cm*

$\epsilon = 26900 \frac{L}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$  *coeficiente de extinción molar*

**10<sup>3</sup>** = *factor de conversión de mg a g*

## RESULTADOS

**Tabla 1:** Resultados del contenido de antocianinas.

<b>Muestra</b>	<b>Contenido total promedio de antocianinas monoméricas (cianidina-3-glucosido mg/100g)</b>	<b>Desviación estándar (cianidina-3-glucosido mg/100g)</b>
<i>Zea mays</i> (Harina morada)	69.09	1.22
<i>Vaccinium meridionale</i> (Mortiño)	10.62	0.11
<i>Hibiscus</i> (Flor de Jamaica)	26.54	0.16
<i>Prunus domestica</i> (Ciruela Pasa)*	-0.26	0.15
<i>Brassica oleracea</i> (Col morada)	19.97	0.22
Té frutos rojos	43.64	1.71

\*El extracto de esta muestra (coloración amarillenta) no correspondía al rango de color requerido para cuantificar antocianinas, lo mismo sucedió con arándanos secos (muestra turbia sin color), uvas pasas, rábanos y berenjena (coloración amarillenta).

## DISCUSION

Las muestras con mayor contenido reportado fueron de harina de maíz morado (*Zea mays*), hibisco (*Hibiscus*), mortiño (*Vaccinium meridionale*) y Té de frutos rojos como parte de los alimentos procesados. Se analizaron más muestras procesadas como arándanos secos, uvas pasas, ciruela pasa, berenjena fresca y rábano fresco. No obstante, estas muestras evidenciaron un color amarillento al momento de ser extraído, esto impidió la cuantificación de antocianinas cuyas longitudes de onda referenciales para el experimento son 520 y 700 nm. Por ende, los valores obtenidos fueron inconsistentes con el resto de las muestras. Las variaciones reflejadas en las desviaciones estándar se pueden atribuir a la turbidez y partículas dentro de la muestra. Se intentó filtrar las muestras con un filtro de jeringa de nylon (para evitar absorción de antocianinas) de 0.44 micras, no obstante, este método no era efectivo por la cantidad de material particulado. Otra posibilidad es la degradación de las muestras al momento de ser procesadas para su análisis. Todas las soluciones se empleaban en un lapso máximo de 5 minutos para evitar descomposición de las antocianinas. Adicionalmente, los contenedores en donde se procesaban y almacenaban las muestras se encontraban cubiertos y lejos de la incidencia de la luz para evitar al foto-degradación.

Al momento de la extracción se empleó una técnica de secado que implica calor, lo cual pudo causar la degradación de antocianinas dentro de la muestra. Por ello, se recomienda técnicas como la liofilización que reduzcan la degradación térmica.

Durante el empleo del ultrasonido para facilitar la extracción, se controló que la temperatura del agua y la muestra no supere la temperatura ambiente para evitar descomposición o evaporación de la muestra afectando su concentración. Adicionalmente, con el fin de reducir errores e incertidumbres, para todos los análisis se empleó la misma celda de cuarzo.

Con respecto a las concentraciones identificadas, Garzón (2010) reporta valores de  $329 \pm 28$  mg de cianidina-3-glucósido/100 gramos de muestra para *Vaccinium meridionale* (Mortiño). No obstante, no se puede aseverar que una comparación entre los valores obtenidos en la presente investigación y los datos reportados previamente sea válida, ya que, el método reportado por Garzón (2010) implicó el congelamiento con nitrógeno líquido y no se conoce si se extrajo el agua de la muestra. Sin embargo, al contrastar los datos se evidencia una gran variación entre ambos resultados de  $10.62 \pm 0.11$  mg de cianidina-3-glucósido/100 gramos de muestra y lo presentado anteriormente. Dicha variación puede deberse a que el método empleado en el presente trabajo no es eficiente para esta muestra en específico.

Adicionalmente, Jaakola (2013) menciona que la cantidad de antocianinas presentes es dependiente de factores ambientales como disponibilidad de luz, oxígeno, entre otros. Por ende, es de esperarse las variaciones de las concentraciones entre frutos de diferentes estaciones y regiones. También se consideran variaciones ya que la coloración de las antocianinas depende de la matriz. Denev (2010) indica que los métodos de extracción comunes no son selectivos, por lo cual, se incluyen azúcares, pectinas, ácidos orgánicos, proteínas, entre otros que pueden crear diferencias en la respuesta de diferentes muestras hacia los tratamientos o técnicas de medición. Por otro lado, es importante establecer una metodología de extracción de acuerdo a la localización de las antocianinas dentro de la muestra vegetal. Jaakola (2013) indica que las frutas pueden contener flavonoides en su pulpa, piel, en ambas o solamente acumular antocianinas en la capa externa como una respuesta a la exposición a la luz. Por ende, la metodología debe ser seleccionada en base a la muestra específica para maximizar la extracción y evitar degradación de las antocianinas.

Respecto a *Zea Mays*, Zilic (2012), indica que dependiendo de algunas especies su contenido de antocianinas varía entre 267 y 337 mg cianidina-3-glucósido/kg. En el presente trabajo se identificó  $69.09 \pm 1.22$  mg de cianidina-3-glucósido/100 gramos de muestra. Las

diferencias radican en el procedimiento de medición, ya que, las mediciones se realizaron a 535 nm, a diferencia del presente método que se realizó a 520 nm. Según Patras (2010) la cianidina es una de las antocianinas que se encuentran de forma más frecuente en las muestras, por ello, es el referente. Dado que existe una variedad de estos flavonoides y estos se encuentran en diferentes abundancias en cada tipo de vegetal, es posible que a diferentes longitudes de onda las absorbancias varíen evidenciando mayor o menor concentración de cianidina-3-glucósido. No obstante, para determinar la abundancia de cada tipo de antocianina se deben realizar estudios más profundos con técnicas de HPLC. Esto permitirá elucidar qué antocianina predomina en la muestra y, por ende, la longitud de onda idónea para la realización de pruebas con dicho espécimen específico.

Adicionalmente, en muchos estudios las muestras fueron procesadas con metanol acidificado con ácido clorhídrico, a diferencia del presente experimento que empleó etanol al 99.5 %. Bowen-Forbes (2010), realizó experimentos con etanol, metanol y hexano, donde diferentes especies tenían diferentes tasas de extracción en cada solvente. Por ende, las muestras con mayor potencial se deben procesar de acuerdo a diferentes métodos de extracción y distintos solventes para determinar aquel que presente mayor eficiencia de acuerdo al caso. Para mejorar los resultados y reducir la variabilidad, se recomienda el desarrollo de otro método de filtración por membrana, preferencialmente membrana de nylon para no absorber o adsorber antocianinas.

El método de extracción empleado no fue el más efectivo ya que, los datos encontrados en la literatura no tienen similitud inmediata con lo encontrado en la presente investigación. No obstante, el método de pH diferencial con uso de espectrómetro UV-VIS evidenció ser un método efectivo para la determinación inicial de contenido de antocianinas. Aquellas muestras que evidenciaban una mayor coloración dentro del rango esperado, eran las que presentaban mayor contenido de antocianinas monoméricas totales. Se realizó un barrido de la muestra

desde 400 nm a 750 nm evidenciando que, la longitud de onda propuesta por el procedimiento descrito por AOAC International (2016) en el cual se basó el presente experimento, efectivamente tiene altas tasas de absorción en lo que respecta a las muestras que tienen la coloración esperada.

## CONCLUSIONES

A través del empleo del método de pH diferencial, las muestras con mayor contenido de antocianinas fueron de harina de maíz morado (*Zea mays*), hibisco (*Hibiscus*), mortiño (*Vaccinium meridionale*) y Té de frutos rojos como parte de los alimentos procesados. Se dificulta la comparación de valores obtenidos con otras fuentes dada la distinción de los procedimientos empleados. Se considera que sí hay muestras que son potencial fuente de pigmentos y se recomienda estudios a profundidad para identificar el rango de flavonoides de la muestra y los métodos de extracción más adecuados.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AOAC International. (2016). *Official methods of analysis of AOAC International*. Arlington, Va: AOAC International.
- Bowen-Forbes, C. S., Zhang, Y., & Nair, M. G. (2010). Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of food composition and analysis*, 23(6), 554-560.
- Del Carpio, C. Caracterización De Las Antocianinas De Los Frutos De Lechler. *Food Science & Technology Department, The Ohio State University*, 110, 43210-1007.
- Denev, P., Ciz, M., Ambrozova, G., Lojek, A., Yanakieva, I., & Kratchanova, M. (2010). Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties. *Food Chemistry*, 123(4), 1055-1061.
- El-Wahab, H. M. F. A., & Moram, G. S. E. D. (2013). Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats. *Toxicology and industrial health*, 29(2), 224-232.
- Garzón, G. A., Narváez, C. E., Riedl, K. M., & Schwartz, S. J. (2010). *Chemical composition, anthocyanins, non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (Vaccinium meridionale Swartz) from Colombia*. *Food Chemistry*, 122(4), 980–986. doi:10.1016/j.foodchem.2010.03.017
- Jaakola, L. (2013). New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends in plant science*, 18(9), 477-483.
- 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.

- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(1), 3-11.
- Ramirez, R. L., Quiñones, W., & Echeverri, F. (2007). Perfil cromatográfico de las antocianinas presentes en algunos frutos colombianos. *Scientia et Technica*, *13*(33), 275-276.
- Tsuda, T. (2012). Dietary anthocyanin-rich plants: biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Molecular nutrition & food research*, *56*(1), 159-170.
- Žilić, S., Serpen, A., Akilloğlu, G., Gökmen, V., & Vančetović, J. (2012). Phenolic Compounds, Carotenoids, Anthocyanins, and Antioxidant Capacity of Colored Maize (*Zea mays* L.) Kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(5), 1224–1231. doi:10.1021/jf204367z