



**UNAP**



**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**TESIS**

**IDENTIFICACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS POR  
ACOPLAMIENTO CON MAGNESIO DE *Dioscorea trifida* L. PARA SU USO EN  
ALIMENTOS 2023**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR:**

**SEVERINO GALLARDO DAHUA**

**DARIO TAMAYA ANDRADE**

**ASESOR:**

**Ing. CLETO JARA HERRERA, Dr.**

**IQUITOS, PERÚ**

**2024**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N°021-2024-CGT-FFyB-UNAP**

En el caserío de Nina Rumi, distrito de San Juan Bautista, departamento de Loreto, a los 19 días del mes de diciembre del 2024, a horas *4:30 pm* se dio inicio a la sustentación pública de Tesis titulada "IDENTIFICACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS POR ACOPLAMIENTO CON MAGNESIO DE *Dioscorea trifida* L. PARA SU USO EN ALIMENTOS 2023", aprobada con Resolución Decanal N°304-2024-FFyB-UNAP, presentado por los bachilleres SEVERINO GALLARDO DAHUA y DARIO TAMAYA ANDRADE, para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico que otorga la Universidad de acuerdo con Ley y Estatuto.

El jurado calificador y dictaminador designado mediante Resolución Decanal N°188-2024-FFyB-UNAP, está integrada por:

Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Dra.	Presidente
Q.F. LUIS DOMINGO NONATO RAMÍREZ, Dr.	Miembro
Q.F. LILIANA RUIZ VÁSQUEZ, Dra.	Miembro
Ing. CLETO JARA HERRERA, Dr.	Asesor

Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas necesarias, las cuales fueron respondidas: *satisfactoriamente*

El jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

La sustentación pública de la tesis ha sido *aprobada* con la calificación *muy buena*

Estando los bachilleres aptos para obtener el Título Profesional de Químico Farmacéutico.

Siendo las *5:45 pm* se dio por terminado el acto *académico de sustentación*

*[Signature]*  
Q.F. FRIDA ENRIQUETA SOSA AMAY, Dra.  
Presidente

*[Signature]*  
Q.F. LUIS DOMINGO NONATO RAMÍREZ, Dr.  
Miembro

*[Signature]*  
Q.F. LILIANA RUIZ VÁSQUEZ, Dra.  
Miembro

*[Signature]*  
Ing. CLETO JARA HERRERA, Dr.  
Asesor

## Jurado y Asesor



---

Q.F. Frida Enriqueta Sosa Amay, Dra.  
Presidente de Jurado calificador y dictaminador  
CQFP: 03468



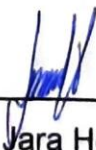
---

Q.F. Liliana Ruiz Vásquez, Dra.  
Miembro de Jurado calificador y dictaminador  
CQFP: 12491



---

Q.F. Luis Domingo Nonato Ramírez, Dr.  
Miembro de Jurado calificador y dictaminador  
CQFP: 05652



---

Ing. Cleto Jara Herrera, Dr.  
Asesor  
CIP: 63042




## 8% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

### Filtrado desde el informe


- Bibliografía
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

### Fuentes principales

- 7%  Fuentes de Internet
- 2%  Publicaciones
- 4%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

### Marcas de integridad

#### N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Texto oculto**  
15 caracteres sospechosos en N.º de página  
El texto es alterado para mezclarse con el fondo blanco del documento.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo infinitamente a Dios, quien ha establecido las condiciones para que se produzca el maravilloso regalo de la vida, el cual considero que es el milagro más valioso.

Asimismo, éste trabajo dedico, como consecuencia de duro esfuerzo a mis honorables y queridos padres: Greysi y Kevin, como también a mis amados abuelos Clotilde y Adán, así como también a mi muy querida hermana Paola y sobrina Hannah, los cuales concentran todo mi afecto, ternura y admiración.

Además, dedico este trabajo a Lizeth Grandez, una extraordinaria persona y especial para mí, alguien muy significativo en mi vida, a quien valoro profundamente y admiro enormemente. Su presencia ha sido fundamental para brindarme estabilidad en mi camino.

***Severino Gallardo Dahua***

Quiero dedicar este trabajo a mis padres, Javier Ignacio Tamaya Carihua y Asunciona Andrade Arimuya, quienes han sido la luz de mi vida. Agradezco su apoyo inquebrantable, tanto emocional como financiero, así como sus sabios consejos y paciencia. Todo lo que soy hoy en día se lo debo a ellos, mis queridos padres.

Asimismo, deseo expresar mi agradecimiento a toda mi familia por el constante respaldo que me han ofrecido a lo largo de cada etapa de mi formación universitaria.

***Dario Tamaya Andrade***

## Agradecimiento

Agradecemos a Dios, quien es la razón más plausible detrás de la creación del universo y a quien reconocemos como la fuente de nuestra propia existencia, por habernos permitido crecer tanto a nivel personal como profesional a lo largo de estos años y por habernos bendecido con el regalo de pertenecer a nuestras maravillosas familias.

Deseamos expresar nuestro profundo agradecimiento a nuestras familias, familia Gallardo Dahua, a mi madre **Greysi Dahua Vega**, por su amor y apoyo incondicional que ha sido fundamental en cada etapa de mi vida, su guía y ejemplo ha sido una luz constante para mí. También, a mi padre **Cristobal Kevin Chire Mayhuasca**, por sus sabios consejos y apoyo inquebrantable que ha sido un pilar fundamental en mi desarrollo personal. A la familia Tamaya Andrade, **David, Maireth, Perla, Javier y Asunción** por su apoyo constante a lo largo de mi vida. Valorizo sus consejos, sus palabras de aliento, su presencia inquebrantable y su capacidad para permitirme tomar mis propias decisiones, siempre alentándome en cada paso que doy.

Finalmente, queremos expresar nuestro profundo agradecimiento a los Ingenieros **Julio Arce Hidalgo** y **Cleto Jara Herrera**, con cuyas sabidurías, orientaciones y constante estímulo y apoyo profesional fueron fundamentales en el proceso de realización de este trabajo de investigación.

## Índice de contenido

Portada	i
Acta de sustentación	ii
Jurado y Asesor	iii
Resultado del informe de similitud	iv
Dedicatoria	v
Agradecimiento	vi
Índice de contenido	vii
Índice de tablas	ix
Índice de figuras	x
Resumen	xi
Abstract	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	4
1.1. Antecedentes	4
1.2. Bases teóricas	7
1.2.1. Especie materia de estudio	7
1.2.2. Antocianinas	9
1.2.3. Parámetros fisicoquímicos	13
1.2.4. Propiedades biológicas de las antocianinas	16
1.2.5. Biogénesis de las antocianidinas y/o antocianinas	17
1.2.6. Localización de las antocianinas	19
1.2.7. Métodos de separación de las antocianinas y su identificación mediante la determinación de los valores R <sub>f</sub>	19
1.2.8. Estabilización de las antocianinas	23
1.3. Definición de términos básicos	29
CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES	31
2.1. Formulación de la hipótesis	31
2.2. Variables de estudio y su operacionalización	31
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	33
3.1. Diseño metodológico	33
3.2. Diseño muestral	33
3.3. Procedimiento de recolección de datos	34
3.4. Procesamiento y análisis de datos	40

3.4.1. Identificación de los componentes antociánicos por cromatografía de papel monodimensional	40
3.4.2. Identificación de las antocianidinas por cromatografía de papel monodimensional	41
3.4.3. Estabilización de las antocianinas	41
3.4.4. Determinación de pH	42
3.4.5. Cálculo de la estabilidad del colorante en función de la absorbancia Vs el tiempo	42
3.5. Aspectos éticos	42
CAPÍTULO IV: RESULTADOS.	44
4.1. Rendimiento de antocianinas	44
4.2. Características fisicoquímicas: comportamiento de las antocianinas según el sistema de solventes	44
4.3. Colorante de <i>D. trifida</i> L. estabilizado	44
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	46
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	54
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES	55
CAPÍTULO VIII. FUENTES DE INFORMACIÓN	56
ANEXOS	64
Anexo 1. Identificación botánica de la planta	64
Anexo 2. Fotografía del proceso	65
Anexo 3. Determinación del rendimiento del colorante de <i>D. trifida</i> L	66
Anexo 4. Determinación de los vales de Rf de las antocianinas	67
Anexo 5. Determinación de los vales de Rf de las antocianidinas	69
Anexo 6. Determinación de los pesos de muestra y reactivos	71
Anexo 7. Determinación de la vida útil del colorante acomplejado con Magnesio II	72



## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Valores Rf de algunas antocianinas comunes y fuente del que proceden (3)	14
<b>Tabla 2.</b> Valores Rf de la antocianidinas comunes y coloración (3)	14
<b>Tabla 3.</b> Antocianidinas en medio ácido HCl y color	16
<b>Tabla 4.</b> Valores de longitud de onda máxima de las antocianidinas	16
<b>Tabla 5.</b> Características del colorante estabilizado de <i>D. trifida</i> L.	45

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema de las antocianidinas	11
<b>Figura 2.</b> Equilibrio ácido-base en antocianinas, ejemplo cianidina 3,5-diglucósido (41)	15
<b>Figura 3.</b> Anillos de la antocianidina en la estructura flavano	17
<b>Figura 4.</b> Biosíntesis de las antocianidinas y antocianinas (41)	18
<b>Figura 5.</b> Complejo de coordinación o quelato hexacoordinado de geometría octahedral del magnesio con antocianina	28
<b>Figura 6.</b> Estructura del $[\eta^6(\text{antocianina})_6\text{Magnesio II}].6\text{Cl}^-$	28
<b>Figura 7.</b> Esfera interna y externa de coordinación del complejo	29
<b>Figura 8.</b> Diagrama de bloques del estudio identificación y estabilización de antocianinas de <i>D. trifida</i> L	35

## Resumen

*Dioscorea trifida* L. (Sachapapa morada) es una planta de la familia Dioscoreaceae de origen silvestre y utilizada en la alimentación por los grupos nativos que pueblan la amazonia desde siglos. El objetivo del presente trabajo fue extraer la matriz del colorante y estabilizar por derivatización mediante la formación de un complejo de coordinación utilizando óxido de magnesio y HCl. La muestra fue recolectada en el centro poblado de Nuevo Oriente, Distrito de Mazan, Provincia de Maynas, Región Loreto. El tubérculo fue rallado para reducirlo a partículas pequeñas. Para extraer el colorante matriz se usó metanol acidulado con ácido clorhídrico para llevarlo a medio ácido. La identificación de los componentes del colorante matriz fue mediante cromatografía de papel, y usando como solventes de resolución ácido clorhídrico concentrado - ácido acético - agua y ácido clorhídrico concentrado - ácido fórmico - agua. Las antocianidinas identificadas fueron: cianidina, peonidina, malvidina y pelargonidina, y sus respectivas antocianinas fueron: cianidina-3-rhamnosil-glucósido, peonidina-3,5-diglucósido, malvidina-3,5-diglucósido y pelargonidina-3,5-diglucósido. La estabilización de las antocianinas se logró por reducción del ion flavilio al formarse el complejo de coordinación hexacoordinado de estructura geométrica octaedral denominado  $[\eta^6(\text{antocianina})_6\text{Magnesio II}].6\text{Cl}^-$  a pH 3,5 de color azul intenso. Se obtuvo 2,086g de colorante estabilizado, constituyendo un nuevo método de estabilización de los colorantes naturales que servirá en futuras investigaciones para determinar su grado de toxicidad y hacer posible su uso en la industria de colorantes naturales.

**Palabras Clave.** *Dioscorea trifida* L, antocianidinas, antocianinas, estabilización por formación de un complejo de coordinación.

## Abstract

*Dioscorea trifida* L. (Sachapapa morada) is a plant of the Dioscoreaceae family of wild origin and used in food by the native groups that have populated the Amazon for centuries. The objective of the present work was to extract the dye matrix and stabilize it by derivatization through the formation of a coordination complex using magnesium oxide and HCl. The sample was collected in the town of Nuevo Oriente, Mazan District, Maynas Province, Loreto Region. The tuber was grated to reduce it to small particles. To extract the matrix dye, methanol acidified with hydrochloric acid was used to bring it to an acid medium. Identification of the matrix dye components was by paper chromatography, using concentrated hydrochloric acid - acetic acid - water and concentrated hydrochloric acid - formic acid - water as solvents for resolution. The anthocyanidins identified were: cyanidin, peonidin, malvidin, and pelargonidin, and their respective anthocyanins were: cyanidin-3-rhamnosyl-glucoside, peonidin-3,5-diglucoside, malvidin-3,5-diglucoside and pelargonidin-3,5-diglucoside. The stabilization of the anthocyanins was achieved by reduction of the flavilium ion upon formation of the hexacoordinate coordination complex of an octahedral geometric structure named  $[\eta^6(\text{anthocyanin})_6\text{Magnesium II}].6\text{Cl}^-$  at pH 3.5 of intense blue color. It obtained 2.086g of stabilized dye, constituting a new method of stabilization of natural dyes that will serve in future investigations to determine its degree of toxicity and to make possible its use in the natural dyes industry.

**Keywords.** *Dioscorea trifida* L, anthocyanidins, anthocyanins, stabilization by forming a coordination complex.

## INTRODUCCIÓN

El tubérculo de *Dioscorea trifida* L (sachapapa morada) de la familia Dioscoreaceae posee un color violáceo intenso (1), tiene un alto contenido de antocianinas (2), que no se desmejoran aun cuando es llevado a cocción para servir de alimento por ser valiosa fuente de carbohidratos, es ampliamente consumido en la región por los grupos nativos que viven en el interior del bosque.

En la amazonia peruana específicamente en la región Loreto, existe una innumerable variedad de especies vegetales que contienen pigmentos flavonoidales denominadas antocianinas que dan colores escarlatas, rojo, purpura y azulejo a las flores, frutos, hojas y otros tejidos (3). Pero mucho de ellos de abundancia limitada en semillas, rizomas, bulbos, tubérculos y raíces.

La especie *D. trifida* L ha sido materia de estudio por varios investigadores, por ejemplo, se ha evaluado la actividad antioxidante y se ha determinado el contenido total de polifenoles y antocianinas (4), este mismo autor identificó agliconas de peonina, cianina y pelargonina siendo novedosa la presencia de peonidina-3-O-P-coumaril-glucósido-5-O-glucósido (5). Otro investigador identificó peonidina-3,5-diglucósido, malvidina-3,5-diglucósido y malvidina-3,5-diglucósido-ácido ferúlico que le dan coloración a la *D. trifida* L (6), también, se ha extraído antocianinas monoméricas, entre las que se destaca cianidina-3-glicósido (7) y por atomización se ha logrado obtener colorante en polvo (2). Por otra parte, se ha evaluado el efecto de la sustitución parcial de harina de trigo, por harina de sachapapa morada (*D. trifida* L) en la elaboración del pan (8,9).

Es necesario señalar que, se han realizado estudios de antocianinas en otras especies vegetales por varios investigadores, en Arándanos de Noa fue determinado antocianinas totales entre las que se encontró fue malvidina-3-glucósido (10). En fruto de *Chrysobalanus icaco* L. se encontró cianidina-3-arabinósido, cianidina-3,5-diglicósido y delfinidina-3,5-diglicósido (11). En frutos de *Renealmia regmeliana* (Jingereraceae) se separó varias antocianinas: petunidina-3-monoglucósido, petunidina-3,5-diglucósido, malvidina-3,5-diglucósido y delfinidina-3,5-diglucósido (12).

También, se ha investigado las propiedades antioxidantes de los compuestos antociánicos del trigo azul (13), en frutos y hojas de zarzamora, frambuesa (14), en cáscara de pitahaya (*Hylocereus undatus*) (15). Además, se ha determinado los componentes antociánicos en granos de cereales azules, rosas, rojos, negros y púrpuras (16). En otras investigaciones se reporta haber extraído antocianinas de frambuesa (*Rubus idaeus* L) (17), de morera silvestre (*Morus nigra* L) (18), de maíz morado (*Zea mays* L.) (19), de uva (*Vitis vinifera* L.) (20) y de mora catilla (*R. glaucus*) y silvestre (*R. adenotrichos*) (21) y se ha estudiado la acumulación de antocianinas durante su desarrollo del tubérculo de la papa (22).

Las antocianinas o antocianidinas glicosídicas comúnmente conocidas son seis pelargonina, cianina, peonina, delfinina, petunina y malvinina, estos compuestos siempre están glicosiladas en la posición 3, pero por hidrólisis pierden el grupo glicósido se convierten en agliconas entonces se les denominan antocianidinas tales como: pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina y malvidina (3).

En su estructura molecular cuenta con un ion catión con carga positiva (+) adyacente al carbono 2 que les hace susceptibles al ataque nucleofílico de compuestos como peróxido de hidrógeno, ácido ascórbico, dióxido de azufre o incluso agua. Además pierde la pigmentación en presencia de oxígeno y varias enzimas, y también como resultado de altas temperaturas de procesamiento y la variación del pH, siendo necesario reconocer que cierto grado de estabilización del pigmento puede lograrse por acilación con varios ácidos orgánicos, copigmentación, autoasociación y por quelación o formación de complejos de coordinación con metales divalentes como Magnesio y Zinc; iones que dan un marcado efecto sobre la estabilidad de las antocianinas y sobre el color del medio donde se hallan estos pigmentos (23).

La importancia de los colorantes antociánicos en la alimentación humana es insoslayable, pero tiene el inconveniente de ser poco estable debido a su alta reactividad natural, razón por la que se degradan rápidamente perdiendo su vistoso color de fruto fresco terminando en un color café o incoloro (23).

Debido a los efectos benéficos para la salud humana como polifenol con actividad antioxidante se viene realizando estudios para lograr su estabilidad usando varios materiales, por ejemplo, para estabilizar las antocianinas extraídas de maíz criollo azul, especialmente cianidina se usó metales de calcio II, cobre II y hierro II y III (24), se encapsulan las antocianinas de *Zea mays* L. (25), los extractos de antocianinas de berenjena (*Solanum melongena* L.) con maltodextrina y aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) (26). Las antocianinas cianidina y malvidina extraídas de *Zea mays* L se estabilizan con nanofibras de gliadina (27), de arándanos con alginato de sodio (28), de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L con goma adraganta, pectina citrus, maltodextrina y goma arábiga (29) y las cascara de jabuticaba (*Myrciaria* ssp) con maltodextrina y goma arábiga (30).

Las antocianinas podrían constituirse una gran alternativa para reemplazar definitivamente a los colorantes sintéticos específicamente al rojo N.º 40, colorante azoico que produce hiperactividad y déficit de atención infantil, tiene actividad nociva, cuando se degrada produce aminas y bases aromáticas cancerígenas. Sin embargo, este colorante se continúa empleando en alimentos, farináceas, cárnicos, lácteos, bebidas afrutadas, cosméticos y productos farmacéuticos; a pesar de sus efectos nocivos: cancerígenos, tumorales, inflamatorios e inductores de la diabetes (31). Frente a esta situación la FDA no se pronuncia sobre su eliminación definitiva, que sentaría un precedente para dejar de utilizar con propósitos alimentarios todos los colorantes de naturaleza azoica y diazoica tales como: amaranto, rodamina, tartrazina, eozina, etc.

En base a esta información es preciso incentivar el uso de los pigmentos antociánicos existentes en los vegetales que presentan beneficios para la salud por sus propiedades antioxidantes y contra el estrés metabólico. Por eso el propósito de este trabajo de investigación fue estabilizar los compuestos antociánicos del colorante matriz aislado de *D. trífida* L (sachapapa morada) por acoplamiento con Magnesio II formando un complejo de coordinación antociánica hexacoordinado siguiendo ciertas pautas que señala la literatura (32,33). Además, identificar los constituyentes antociánicos del colorante, con lo que, se espera ampliar el conocimiento acerca de la estabilización de los pigmentos antociánicos.

## CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes

En el 2019, se estudió los frutos de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L. adquiridos en la empresa Ponto Agrícola - Unipessoal, Lda, para extraer el colorante usaron licuadora y filtraron, luego liofilizó. Las antocianinas fueron identificadas por análisis UPLC-DAD-ESI/MS. El colorante fue estabilizado usando dos métodos: spray drying para formulaciones sólidas y como agentes estabilizadores fue maltodextrina y goma arábica, y para formulaciones líquidas la gelificación térmica, y como estabilizadores fue pectina de cítrico y goma de adraganta. En el extracto de *M. nigra* L identificaron dos antocianinas cianidina-3-O-glucosa y cianidina-O-ramnosa-O-hexosa y en el extracto de *R. fruticosus* L. identificaron cuatro antocianinas: cianidina-O-hexosa, cianidina-3-O-glucosa, cianidina-O-pentosa y cianidina-3-O-dioxaloilglucosa. La microencapsulación para formulaciones sólidas mostró mayor estabilidad del color en el tiempo que las formulaciones líquidas. El autor señala que, ninguna de las formulaciones mostró citotoxicidad en células hepáticas no tumorales, y por tanto pueden ser consideradas adecuadas para su uso en alimentos sin riesgos de toxicidad (29).

En el 2018, fue caracterizado mediante pruebas de color las antocianinas y las betacianinas, en nueve extractos de plantas: en la raíz de *Beta vulgaris* (remolacha roja) en flores de *Viola wittrockiana* (Pensamiento), *Dhalia sp.* (dalia), *Zygocactus truncatus* (cactus de navidad), *Rosa sp.* (rosa), *Saintpaulia ionantha* (violeta africana), *Mirabilis jalapa* (flor del día), *Pelargonium sp.* (geranio) e *Impatiens balsamina* (cristalina) y se halló que las antocianinas son más estables que las betacianinas, pero cambian de color en función del pH; mientras que las betacianinas sufren cambios muy leves y se degradan a pH alcalino. Además, las antocianinas en solución de metanol ácido clorhídrico realzan su color y son captados en la región ultravioleta del espectro y los componentes pueden separarse fácilmente por cromatografía de papel al usarse como fase móvil el sistema BAW (butanol: ácido acético: agua) (34).



En el 2014, se estudió de *Solanum melongena* L. (berenjena morada). Las muestras fueron recolectadas en Córdoba, caserío Retiro de los Indios. Para extraer el pigmento fue usado etanol acidificado al 50 % durante tres horas a 30°C. El extracto con contenido de antocianinas fue estabilizado con maltodextrina por microencapsulación y secado por aspersion a temperatura de 180°C. Para evaluar la estabilidad del producto prepararon dos tipos de bebidas, una isotónica y otra bebida con Aloe vera; a las que añadieron el polvo micro encapsulado a las bebidas, luego fueron almacenadas a temperatura de 4°C y 25°C. La temperatura de almacenamiento influyó en la estabilidad de las antocianinas y en los parámetros de color, a 25°C se produjo mayor velocidad de degradación. La bebida isotónica a base de maltodextrina y Aloe vera y a 4°C presentó mayor retención de antocianinas de 54 y 77,5% respectivamente que las bebidas adicionadas sin encapsular. Finalmente señalan que hay evidencia de degradación de las antocianinas si se añade estabilizadores sin encapsular (26).

En el 2010, se determinó el contenido total de antocianinas y polifenoles en *D. trifida* L., las muestras fueron recolectadas en el valle del alto Huallaga, Distrito de Rupa-Rupa (Tingo María), Perú, para conseguir el propósito usó el método de pH diferencial, para polifenoles totales usó el método de Folin-Ciocalteu y como reactivos estándar usó la cianidina-3-glicósido y el ácido gálico respectivamente. El contenido de antocianinas presentes fue de 21,59mg/100g de muestra con referencia a la cianidina-3-glicósido y con respecto a polifenoles totales el resultado fue 166,10mg/100g de muestra con referencia al ácido gálico. El autor señala que, los pigmentos de *D. trifida* L presentan un efecto protector de peroxidación de lípidos en suero humano in vitro (4).

En el año 2009, se estudió al maíz de pigmentado azul, para lo cual realizó dos tipos de extracciones; primero, para obtener el extracto no hidrolizado usó solución de HCl al 2% en metanol a 48°C; la segunda, para el extracto hidrolizado usó metanol y HCl (1:1) a 60°C, estos extractos fueron concentrados y liofilizados. La identificación de las antocianinas fue por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para medir la estabilidad natural de las antocianinas del grano de maíz, usó extractos no hidrolizado y liofilizado respectivamente a las cuales añadió las soluciones de metales preparados y midió las absorbancias en un

espectrofotómetro. Identificaron seis metales: Ca, Cu, Fe, K, Mg y Mn. La antocianina presente en mayor cantidad fue cianidina (Cy), el estudio señala que Ca, Cu y Fe se hallan en mayor concentración en el endocarpio, mientras que el pericarpio contiene mayor concentración de Cu que en el grano total, lo que sugiere que el cobre es el metal responsable de la estabilidad de la antociana en este maíz y el que le da la coloración característica (24).

El 2009, se usó corontas de maíz morado para extraer antocianinas de mazorcas recolectadas en un campo experimental del distrito de la Joya en la región Arequipa-Perú, para determinar el contenido de antocianinas usó el método de pH diferencial a pH 2 y a pH 4, además, observaron otros factores tales como: solución de extracción, temperatura y tiempo. Con la variación de los pH indicados obtuvo 8,404 y 47,984mg de antocianina respectivamente por gramo de muestra. El autor señala que, la extracción de antocianinas depende en gran medida de la temperatura, tiempo y el porcentaje de la solución de etanol usado (35).

El 2007, extrajeron antocianinas de *Morus nigra* L., de muestras recolectadas en época de fructificación en un jardín de la ciudad de Sao Paulo, Brasil. Como solvente de extracción usó la mezcla [metanol: agua: ácido acético] (70:30:5 v/v) aisló y purificó por cromatografía de papel, los componentes fueron identificados por análisis HPLC/DAD y espectroscopia de masas. El análisis mostró que los componentes purificados fueron: cianidina-3-glicósido y cianidina-3-glicosil-rhamnósido. El autor señala que, el contenido de antocianinas en esta especie es más alto que los que se reportaron en otros cultivos de moras y puede ser una fuente potencial de antocianinas en la dieta (18).

En el año 1997, se observó cómo se producen cambios en el contenido de antocianinas y variación de color de la superficie exterior del tubérculo *Solanum tuberosum* L (papa roja) durante su desarrollo. La muestra fue recolectada en el cultivar Norland productora del tubérculo. Las antocianinas fueron identificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y los niveles de ARNm en estado estacionario de dihidroflavonol reductasa (DFR) por análisis de transferencia Northern, y llegó a la conclusión que el color de la papa roja se debe

a la acumulación de antocianinas en el peridermis y los tejidos de la corteza periférica, también resaltó que las principales antocianinas presentes en el tubérculo son pelargonidina y peonidina; por otra parte, observó que el croma (intensidad de los enrojecimientos) y el contenido de antocianinas por unidad de superficie disminuyeron a medida que los tubérculos aumentaban de peso. Sin embargo, la biosíntesis natural de antocianinas se da a lo largo del desarrollo del tubérculo y la división celular de agrandamiento contribuye a la disminución del croma y de este modo disminuye la concentración de antocianinas (22)

En el año 1977, aislaron los pigmentos del colorante de *D. trifida* L. con solución de HCl al 0,1% en metanol de muestras adquiridas en un mercado de alimentos en el este de Venezuela, para purificarlos usó papel Whatmann N<sup>o</sup>.3 y como eluyente BAW capa superior [n-butanol: ácido acético: agua (4:1:5)] y para su identificación usó cromatografía de papel teniendo como adsorbente y soporte Whatmann N<sup>o</sup>.1 y como eluyente BAW; además, determinó los valores de R<sub>f</sub> y los espectros de absorción ultravioleta visible. Identificó tres componentes peonidina-3,5-diglicósido, malvidina-3,5-diglicósido y malvidina-3,5-diglicósido-ácido ferúlico; El valor R<sub>f</sub> de peonidina-3,5-diglicósido fue 0,23, de malvidina-3,5-diglicósido 0,31 y de malvidina-3,5-diglicósido-ácido ferúlico 0,34. Los espectros de absorción fueron: para peonidina-3,5-diglicósido 524 nm, malvidina-3,5-diglicósido 532 nm y de malvidina-3,5-diglicósido-ácido ferúlico 532, 318, 286 nm. El estudio señala que, la malvidina-3,5-diglicósido-ácido ferúlico por contener un grupo acilo en el ácido ferúlico puede producir cuatro productos por desacilación del pigmento (6).

## **1.2. Bases teóricas**

### **1.2.1. Especie materia de estudio**

#### **a) Identificación botánica**

Según la clasificación filogenética y el sistema APG II de angiospermas cumple con el esquema siguiente (36)

Reino : Plantae  
División : Magnoliophyta

Clase	: Liliopsida
Orden	: Dioscoreales
Familia	: Dioscoreaceae
Género	: <i>Dioscorea</i>
Especie	: <i>Dioscorea trifida</i> L.
Nombre vulgar	: sachapapa morada, yam tubers, ñame, mapuey

## **b) Descripción botánica**

La descripción botánica de *D. trifida* L por Montaldo (37):

“Tiene rizomas pequeños, no más de 15 cm de largo, redondos o cónicos. Pulpa blanca, amarilla o púrpura. Tallos cuadrangulares, alados, sin espinas. Torción a la izquierda. Hojas palmadas divididas, profundamente lobuladas, alternas, raramente opuestas. El rizoma y las raíces brotan de una especie de cormo que aparece muy temprano en el ciclo de la planta; se encuentra localizado en la base del tallo, no posee tubérculos, ya que las yemas están localizadas en el extremo proximal, junto al punto de unión del cormo. Por tanto, se considera como rizomas a la estructura de reserva de carbohidratos y proteínas de *Dioscorea trifida* L”.

Además, se han descrito las morfologías de los diferentes morfotipos de *D. trifida* L en forma detallada por Beyerlein (38).

## **c) Distribución ecológica de *Dioscorea trifida* L**

Está ampliamente distribuida en el trópico y subtrópico, pero muy poco en regiones templadas (37,39). Se distribuyen en África, Asia, Oceanía, Centro América, México y en América del Sur en la amazonia continental de Venezuela, Colombia, Ecuador y la amazonia peruana (37,39).

## **d) Usos e información etnobotánica**

*D. trifida* L., es una planta comestible, los tubérculos son ricos en carbohidratos, en antocianinas antioxidantes, en Dioscorina proteína soluble en agua que es considerado un poderoso antioxidante y un fitoesteroide que posee propiedades

antiinflamatorias, antinociceptivas y fue materia prima base para la producción de progesterona y cortisona por el profesor Marker en México, los tubérculos crudos rallados se utilizan en emplastos cuando hay inflamaciones de piel (1).

### **1.2.2. Antocianinas**

Estos pigmentos polifenólicos se encuentran en todas las plantas vasculares, pero también han sido detectadas en musgos, en la fronda de los helechos tiernos, así como en Liliophytas y Magnoliophytas (3). El color del órgano vegetal con contenido de antocianinas atrae a los insectos polinizadores que sirven para la dispersión del polen y de las semillas, las antocianinas protegen la planta contra la radiación UV, contaminación viral y bacteriana, se adaptan a diferentes cambios como sequías, falta de nutrientes, ataques de patógenos (40). Las antocianinas pueden confundirse con las betacianinas que son pigmentos que contienen nitrógeno en su estructura heterocíclica, pero fácilmente se observa la diferencia cuando las betacianinas corridas en cromatografía de papel con BAW, tienen una migración muy pequeña del origen hacia el frente del solvente (3).

La literatura señala diez clases de flavonoides: flavonoles, flavonas, glicoflavonas, biflavonilos, chalconas, auronas, flavononas, isoflavonas, leucoantocianidinas y antocianinas, este último flavonoide experimenta una variación de sus pigmentos que van de color escarlata (rojo brillante), rojo, malva (purpura azulejo-pálido) y pigmentos azules de las flores, también estos pigmentos están distribuidos en hojas y otros tejidos de las plantas, se caracterizan por ser solubles en agua y pueden observarse a longitudes de onda máxima de 515 a 545nm en el espectro visible (3).

Las antocianinas son muy inestables y se degradan cuando son separados del material vegetal, la razón de esta degradación es porque sufre una oxidación directa o por acción de enzimas oxidantes. Pero también, por poseer varios grupos hidroxilos en el anillo C que provoca su inestabilidad, estas al reaccionar apertura el anillo heterocíclico y da paso a la formación de chalconas. Además, influyen factores como la temperatura y pH en la degradación de estos compuestos. (40).

La degradación de las antocianinas puede ser producido por factores inducidos, como la contaminación microbiana, las enzimas que degradan los colores son las glucosidasas, peroxidadasas y polifenol oxidasas. Cada una de ellas actúa sobre sus correspondientes sustratos y como producto de estas reacciones enzimáticas las antocianinas se transforman en compuestos incoloros (40).

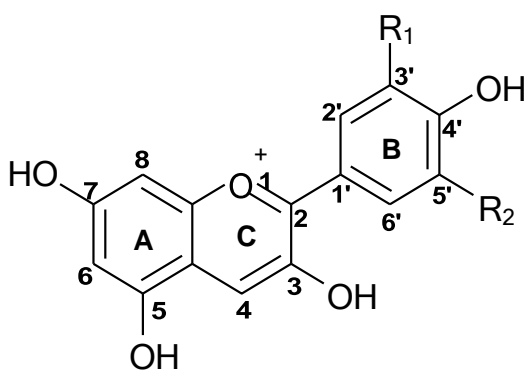
La estructura molecular de las antocianinas como una clase de flavonoides, se basa en un sistema heterocíclico denominado flavano (2-fenil-benzopirano) o 2-fenilcromano, que en diferentes niveles de oxidación da lugar a una clasificación en tipos estructurales tales como: flavonas, flavonoides, flavanonas, flavanos y antocianidinas (catión flavilio), en los que un flavano al ganar un oxígeno en posición 4 y un doble enlace entre las posiciones 2 y 3 se convierte en flavano, si gana el flavona un grupo -OH en posición 3, se convierte en flavonol, si la flavona pierde el doble enlace en las posiciones 2 y 3 se convierte en flavonona.

Si la flavonona pierde el grupo oxígeno de la posición 4 vuelve a flavona, más si el flavano pierde un electrón del oxígeno en la posición 1 se forma un doble enlace entre las posiciones 1 y 2 y al ganar además 2 electrones en las posiciones 3 y 4 da lugar a una antocianidina que es precursora de las antocianinas que recibe este nombre cuando aceptan la presencia de glucósidos en su estructura molecular (41).

Si en las antocianidinas se sustituye el grupo hidroxilo en la posición 3 con un azúcar se conoce como derivado sustituido 3-glucósido y con la sustitución de los hidroxilos de las posiciones 3 y 5 se conoce como derivados sustituido 3,5-diglucósido que da lugar a la pelargonidina derivados mono y disustituidos, igual caso en peonidina y en cianidina los derivados pueden ser: cianidina-3-diglucósido, cianidina-3-rhamnóglucósido, cianidina-3,5-diglucósido, cianidina-3-soforósido o mecocianina, los derivados de la delfinidina son: delfinidina-3-glucósido, delfinidina-3,5-diglucósido, delfinidina con sustitución de una molécula de glucosa, ácido hidroxibenzóico, violena por sustitución de glucosa, rhamnosa y ácido p-hidroxicinámico. La malvidina tiene derivados mono y disustituidos: malvidina-3-glucósido tetrahidratado y malvidina-3,5-diglucósido, la petunidina posee un derivado 3,5-diglucósido (42).

Las antocianinas están basadas en la estructura aromática de la cianidina como molécula precursora y los otros pigmentos son derivados de ésta caso de la delfinidina, peonidina, malvidina, petunidina y pelargonidina ya sea por adición o por sustracción de grupos oxhidrilos o bien por metilación o por glucosilación, si la cianidina tiene un grupo metilo en posición 3', se llamará peonidina, si pierde un grupo oxhidrilo en posición 3' surgirá la pelargonidina, si tiene grupo -OH en posición 5' es la delfinidina, si tiene 2 grupos metilos en posición 3' y 5' será la malvidina, si tiene un grupo -OH en posición 4' y un grupo metilo en posición 3' será la petunidina (3).

La estructura general de una antocianidina representa esquemáticamente como se muestra en la figura 1 y de acuerdo a las funciones sustituyentes en las posiciones R1 y R2 se denomina el tipo de antocianidina.



Antocianidina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Malvidina	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>
Peonidina	-OCH <sub>3</sub>	-H
Pelargonidina	-H	-H
Cianidina	-OH	-H
Delfinidina	-OH	-OH
Petunidina	-OH	-OCH <sub>3</sub>

**Figura 1.** Esquema de las antocianidinas

Las antocianinas o agliconas de las antocianidinas muestran la formación de complejos conjugados en su estructura, como el catión flavílio de color rojo a un pH entre 1 y 2, puede ganar agua y convertirse en una pseudobase carbinol a pH 4,5 donde es incoloro, se convierte en pseudobase chalcona a pH mayor a 7, si pierde hidrógeno se transforma en una base quinonoidal a pH 6-6,5 tomando un color púrpura proceso que es reversible, esto constituye un mecanismo de protección que se conoce como copigmentación que puede ser: copigmentación intermolecular, con otros enlaces no covalentes de sustancias incoloras flavonol o glicósidos de flavonas, así como ésteres de hidroxicinamatos como grupos acilo

aromáticos denominados hidroxicinamatos, que son parte de la estructura de las antocianinas que se hallan apiladas en forma de emparedados (sandwich).

Es muy conocido las antocianinas Heavely Blue (antocianinas azul celeste) compuesto por peonidina con 6 moléculas de glucosa, 3 moléculas de ácido caféico, donde los cafeatos son esterificados con una molécula de glucosa y glucosilados a uno de sus grupos oxhidril aromáticos con una segunda molécula de glucosa, además de la común acilación con hidroxicinamatos dicarboxilatos alifáticos, son comúnmente encontrados como acilos parciales, tales como malonato, maleato u oxalato, son las llamado antocianinas zwitteriónicas o antocianinas que tienen doble polaridad (+ y -) (43).

Las antocianinas conocidas son: cianina, delphinina, pelargonina, petunina, malvina y peonina, cuando estas se hidrolizan con ácido clorhídrico pierde el glucósido y se convierten en agliconas, como la cianidina, delphinidina, pelargonidina, petunidina y malvidina recibiendo la denominación de antocianidinas, la reacción es el siguiente:

Antocianinas + ácido → Antocianidina(aglicona) + Glucósido(azúcar)...(I)

Antocianinas + base → Antocianidina(aglicona) + Glucósido(azúcar)...(II)

Siendo las antocianidinas conocidas como agliconas y los glucósidos como antocianinas (3).

**Estabilidad de las antocianinas**, son muy estables a pH ácido, pero se reduce su estabilidad cuando se aproxima a la neutralidad llegando a destruirse completamente con pH superior a 7, aunque hay antocianinas aciladas como la petunidina-3-[6",4"-p-coumaril-rhamnósido)-5-glucósido] que es muy estable y conserva el color característico a pH alcalino (42).

La estabilidad de las antocianinas se halla asociado con otros compuestos flavonoidales, compuestos fenólicos no flavonoidales, aminoácidos, polisacáridos, iones metálicos y ácidos orgánicos. La asociación de estos compuestos con las antocianinas evita el ataque nucleofílico y desplaza el equilibrio hacia las formas coloridas y en aquellos que forman complejos. El equilibrio puede representarse de la manera siguiente:



Antocianina libre + copigmento  $\Rightarrow$  Antocianinas copigmentadas

Si la concentración de las antocianinas es alta, es porque existe autoasociación entre ellas y actúan como copigmentos, que se mantienen unidas por fuerzas electrostáticas o por interacciones hidrofóbicas. En este caso, la copigmentación se da por apilamiento tipo sándwich entre los grupos acilo de ácidos alifáticos y/o aromáticos con residuos de azúcares de las antocianinas. Pero la copigmentación intermolecular se da con compuestos que tienen electrones  $\pi$  ( $\pi$ ), que se da un solapamiento  $\pi$ - $\pi$  con el ion flavilio (40).

Finalmente, los iones metálicos como el  $Mg^{2+}$  y  $Al^{3+}$  actúan reforzando la interacción entre el pigmento y copigmento, reforzando la copigmentación, por tanto, los metales pueden constituirse en una alternativa para estabilizar el color, siempre y cuando no sea riesgoso para la salud, por ejemplo, calcio y magnesio que son esenciales en la dieta de las personas (40).

### 1.2.3. Parámetros fisicoquímicos

Las principales variaciones del color de las antocianinas están en la naturaleza del azúcar que contiene. Las antocianinas (antocianidinas más el azúcar) presentes en el tejido de las plantas, se extrae por maceración con metanol-HCl por 5 minutos, se filtra o centrifuga, se concentra al vacío a 35-40°C hasta reducir el volumen a 1/5 parte del extracto original.

Para realizar la cromatografía monodimensional se usa papel Whatman como fase estacionaria y como fase móvil los solventes BAW: n-butanol - ácido acético - agua (4:1:5), BuHCl: n-butanol - ácido clorhídrico 2M (1:1) capa superior y en HCl al 1%. Las antocianidinas (agliconas) se separan por hidrólisis del extracto metanólico con ácido clorhídrico concentrado a reflujo por 15 minutos. Para separar las antocianidinas del extracto se somete a cromatografía preparativa en papel de filtro en el sistema forestal: HCl concentrado - ácido acético - agua (3:3:10), las bandas separadas se cortan y extraen con metanol y se vuelve a realizar la cromatografía en los sistemas forestal y fórmico, estas bandas separadas se los determina sus valores de  $R_f$  para identificar los

correspondientes antocianinas. También, es posible separarlos por cromatografía HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) (3).

**Tabla 1.** Valores Rf de algunas antocianinas comunes y fuente del que proceden (3)

Antocianinas	Valores Rf x 100			Fuente de pétalos de flores	
	BAW	BuHCl	1%HCl		
Monoglucósidos	Pelargonidina-3-glucósido	44	38	14	<i>Callistephus chinensis</i>
	Cianidina-3-glucósido	38	25	07	<i>Chrysanthemum sp</i>
	Malvidina-glucósido	38	15	06	<i>Prímula polyanthus</i>
Diglucósidos	Pelargonidina-3,5-diglucósido	31	14	23	<i>Pelargonium sp.</i>
	Cianidina-3-rhamnosil-glucósido	37	25	19	<i>Antirrhinum majus</i>
	Peonidina-3,5-diglucósido	31	10	17	<i>Peonia officinalis mascula (L)</i>
	Delfinidina-3,5-diglucósido	15	03	08	Verbena
Triglucósidos	Cianidina-3-rhamnosil-glucósido-5-glucósido	25	08	36	Prímula del cabo
	Cianidina-3-(2G-glucosilrhamnosilglucósido)	26	11	61	<i>Begonia coccineus</i>
Diglucósidos acetilados	Pelargonidina-3-(p-cumaril-glucósido)-5-glucósido	40	46	19	<i>Monarda didyma</i>

BAW: [n-butanol-ácido acético-agua]

Las antocianinas después de su hidrólisis se convierten en agliconas pierden el azúcar y los valores Rf en cromatografía de papel se muestra en la siguiente tabla (3).

**Tabla 2.** Valores Rf de la antocianidinas comunes y coloración (3)

Antocianidinas	Rf x 100			Color visible
	BAW	Forestal	Fórmico	
Pelargonidina	80	68	33	Rojo
Cianidina	68	49	22	Magenta
Peonidina	71	63	30	Magenta
Delfinidina	42	32	13	Púrpura

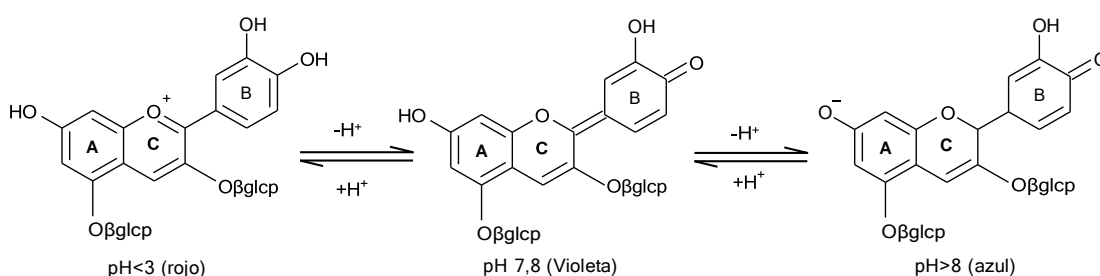
Petunidina	52	46	20	Púrpura
Malvidina	58	60	27	Púrpura

BAW: [n-butanol-ácido acético-agua]

Forestal: [HCl concentrado-ácido acético-agua]

Fórmico: [ácido clorhídrico concentrado-ácido fórmico-agua]

Las antocianinas son pigmentos naturales visibles al ojo humano, son muy sensibles a las variaciones de pH en general adquieren un color rojo en medio ácido y cambian al color azul oscuro cuando se los lleva a pH básico, pasando por el color violeta. La cianidina posee color azul-violeta a pH neutro (23), en medio ácido pH 1,6 es rojo y es de color verde a pH 8,12 y amarillas a pH 12 y 14. El equilibrio ácido-base de las antocianinas de acuerdo con su pH para el caso de la cianidina 3,5-diglucósido según su deshidrogenación muestra los pasos reversibles siguientes (41).



**Figura 2.** Equilibrio ácido-base en antocianinas, ejemplo cianidina-3,5-diglucósido (41)

La cianidina-3,5-diglucósido cuando pierde electrones, el anillo pirano pierde un par de electrones que refuerzan el anillo B que como sustituyente lo hace con un doble enlace transformando al anillo B que de núcleo catecol pasa a ser un núcleo semejante al de una benzoquinona que se torna más violeta, más tarde cuando esta cianidina-3,5-diglucósido con sustituyente benzoquinónico pierde un protón en la posición 7 cambia al color azul, por eso se puede señalar que es posible que las plantas al utilizar cambios intracelulares de pH son capaces de modular el color de sus flores, aunque al parecer también están implicadas iones metálicos y especies moleculares diferentes (41). El color de las antocianidinas en medio ácido (HCl) se muestra en la siguiente tabla (3).

**Tabla 3.** Antocianidinas en medio ácido HCl y color

<b>Antocianidina</b>	<b>Color</b>
Pelargonidina	Rojo
Cianidina	Magneta, varia del rosado intenso al purpura
Peonidina	Magneta
Delfinidina	Purpura
Petunidina	Purpura
Malvidina	Púrpura

Los valores de longitud de onda máxima de las antocianidinas en metanol-HCl se muestra en la siguiente tabla (3).

**Tabla 4.** Valores de longitud de onda máxima de las antocianidinas

<b>Antocianidina</b>	<b><math>\lambda</math> max (nm)</b>
Pelargonidina	520
Cianidina	535
Peonidina	532
Delfinidina	546
Petunidina	543
Malvidina	542

El desplazamiento batocrómico al color azul  $\lambda_{m\acute{a}x}$  580 – 595 nm con  $AlCl_3$  como reactivo de desplazamiento se puede observar en el espectro visible midiendo el valor espectral en metanol-HCl 0,01% y añadiendo  $AlCl_3$  en alcohol al 5%, se observa que el desplazamiento batocrómico es propio de cianidina, delfinidina y petunidina, debido al núcleo de catecol de estas moléculas 1,2-dihidroxibenceno (3,44).

#### 1.2.4. Propiedades biológicas de las antocianinas

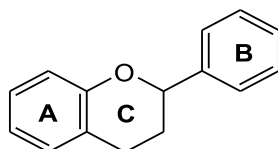
Las antocianinas, debido a sus características físicas y químicas constituyen un grupo de compuestos de amplia versatilidad en la naturaleza. Son bioactivos contra desórdenes de la salud tales como enfermedades cardiovasculares, cáncer

y obesidad, y además de sus propiedades antiinflamatorias, antioxidante, antidiabético, antibacterial, posee capacidad antiproliferativa, actúan sobre el estrés oxidativo, en enfermedades cardiovasculares y degenerativas (30,45).

Las antocianinas se absorben a lo largo del tracto gastrointestinal, primero hacen catabolismo microbial seguido por la absorción y el metabolismo (46). Inhiben el crecimiento de las células cancerígenas y ayudan a prevenir el cáncer de colon, impiden enfermedades del corazón al inhibir la síntesis de colesterol, mejora la circulación y la fragilidad capilar y evitan el envejecimiento (42,47), son efectivos para atrapar ROS (especies reactivas de oxígeno), además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación plaquetaria, mejoran la agudeza visual, así como el comportamiento cognitivo (31,47).

### 1.2.5. Biogénesis de las antocianidinas y/o antocianinas

Las antocianinas son grupos pertenecientes a los pigmentos flavonoidales que tienen un origen metabólico mixto que ha sido demostrado mediante experimentos de marcaje isotópico, estos han puesto de manifiesto que los 6 carbonos del anillo B y 3 del C tales como C2, C3 y C4 provienen del ácido shikímico a través del ácido cinámico o hidroxiderivados del mismo, en cambio los carbonos del anillo A proceden de la vía del acetato o acetogéninas (41).

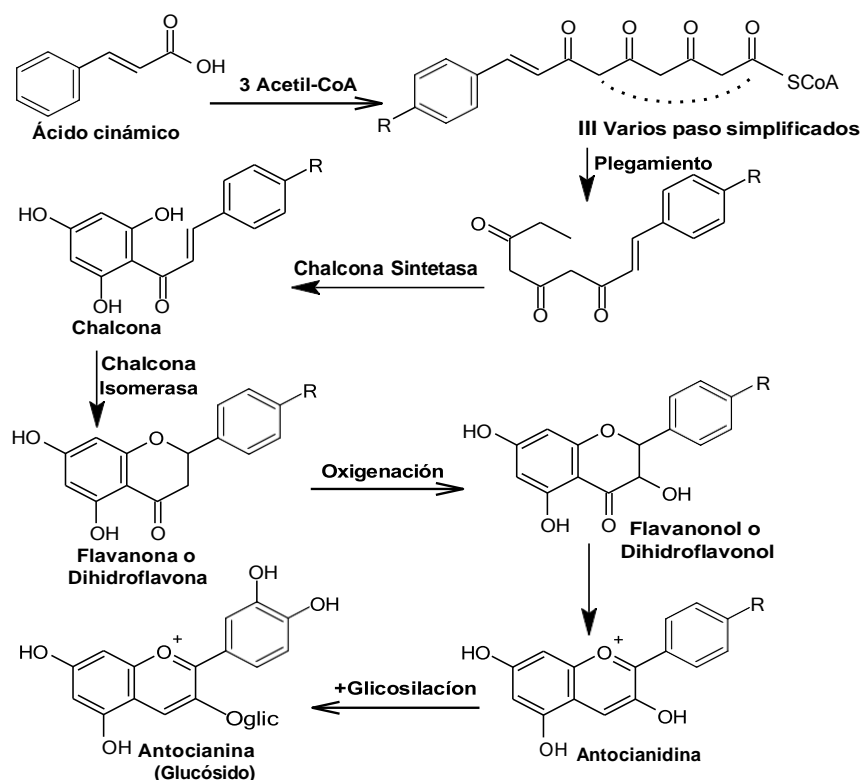


**Figura 3.** Anillos de la antocianidina en la estructura flavano

La conformación del esqueleto de un flavonoide comienza como una cadena policetídica en la que el ácido cinámico o más a menudo el ácido p-cumárico actúan como la unidad iniciadora que es luego alargada con 3 fragmentos del malonato, el plegamiento mediante aldolización intermolecular lleva a un tipo de aciltrifenoles, denominados genéricamente chalconas, esta parte del proceso es catalizada por un subtipo de enzima policétido sintetasa del tipo III, llamado también por dicho motivo chalcona sintetasa (CHS), ya ha sido determinada la

secuencia nucleotídica de los genes que codifican las correspondientes chalconas sintetasas en varios contenedores de especies vegetales.

También se ha determinado mediante difracción de rayos X las estructuras tridimensionales de varios de ellas posteriormente y fuera ya de la enzima (CHS), las chalconas experimentaron una adicción intermolecular que conduce a las flavononas, proceso que es catalizado de manera estero específica por una enzima denominada chalcona isomerasa (CHI), estas experimentan subsiguientes procesos de oxidación o deshidrogenación a flavonas, flavonoles y demás clase de flavonoides todas las cuales son catalizadas por enzimas específicas, además de todos estos procesos básicos se suelen producir otras transformaciones adicionales tales como oxigenaciones, reducciones, o alquilaciones, etc. El ácido cinámico o el p-cumárico, sobre todo, este último, suelen ser las unidades iniciadoras del proceso metabólico. A continuación, señalamos el mecanismo biosintético de las antocianinas (41).



**Figura 4.** Biosíntesis de las antocianidinas y antocianinas (41)

### 1.2.6. Localización de las antocianinas

Las antocianinas están presentes en las flores, frutas, hojas, tubérculos, tallos y raíces, en el interior de las vacuolas de la célula vegetal llamados anticianoplastos los que manifiestan propiedades coloridas diversas (48).

### 1.2.7. Métodos de separación de las antocianinas y su identificación mediante la determinación de los valores Rf

#### A. Por cromatografía de papel

Las antocianinas pueden identificarse por cromatografía de papel, luego de extraer con ácido clorhídrico al 1% para obtener los pigmentos en forma de antoxantinas. A los extractos se añade acetato de etilo, se agita, se añade carbonato de sodio, y la reacción de los pigmentos presentes en el extracto dan un tinte variado de azul a rojo-violeta. El extracto corre en cromatografía de papel usando como solvente de resolución BAW top layer: Butanol - ácido acético - agua (40:10:50 v/v) (12,49). En sistema forestal: ácido clorhídrico concentrado-ácido acético-agua (3:3:10) y en el solvente fórmico: ácido clorhídrico concentrado-ácido fórmico-agua (2:5:3) (3,12); a los pigmentos separados como puntos en el papel se mide con regla milimétrica desde el punto de origen hasta donde llegó en la corrida el soluto. Se mide también el frente del solvente que va desde el origen hasta la altura a la que se desplazó el solvente. El  $R_f \times 100$  ó  $hR_f$  es la relación de distancia de corrida del soluto, sobre la distancia de corrida del solvente así (3):

$$R_f = \frac{\text{Distancia de corrida del soluto}}{\text{Distancia de corrida del solvente}}$$

#### B. Aislamiento y determinación de antocianinas en cromatografía de papel

Las antocianinas se extraen de pétalos frescos de una flor u otro órgano vegetal, si son flores, estos se aplastan en un tubo angosto con un mínimo de metanol, al que se agrega HCl concentrado al 1%, obteniéndose a los 10 o 15 minutos un

extracto suficientemente concentrado para realizar la cromatografía de papel en forma directa. Otro proceso alternativo consiste en macerar mayor cantidad de tejido por 5 minutos en metanol-HCl, este macerado es filtrado y centrifugado y el extracto concentrado al vacío a 35-40°C en rotavapor hasta 1/5 parte del volumen original (3).

También, puede extraerse reduciendo los pétalos a partículas finas y ponerlo en un tubo de prueba en solución de HCl 2M y calentar a 100°C por 4 minutos, El extracto enfriado es 2 veces lavado en embudo de separación con acetato de etilo para quitar las flavonas que podrían estar presentes, se desecha esta capa de acetato de etilo y se toma la capa acuosa, se calienta a 80°C para quitar las trazas de acetato de etilo que quedaron como remanente. La capa acuosa ahora es extractada con pequeño volumen de alcohol amílico el cual puede ser pipeteado y concentrada a sequedad por calentamiento en una luna de reloj o por ebullición en baño maría. La antocianidina en el concentrado es disuelto en 2 gotas de metanol en HCl; luego los extractos son llevados a cromatografía monodimensional en papel Whatman 1 usando como solventes BAW: n-butanol-ácido acético-agua (4:1:5) top layer, o en sistema forestal: HCl concentrado-ácido acético-agua (3:3:10), también el sistema fórmico: HCl concentrado-ácido fórmico-agua (2:5:3), después de la corrida se mide las distancias recorridas por el soluto y por el solvente con las que se determina los valores  $R_f \times 100$ . (3).

### **C. Aislamiento y determinación del valor $R_f \times 100$ de antocianinas en cromatografía de capa fina (TLC)**

Las antocianidinas se separan sobre sílica gel usando como solventes acetato de etilo-ácido fórmico-HCl 2M (85:6:9), pero el color del spot se desmejora rápidamente, por eso luego de la separación es preciso hacer uso de sílica gel grado estandarizado para que las trazas de metal presentes ayuden la separación de peonidina y malvidina de cianidina y delfinidina. La cromatografía de capa fina bidimensional de antocianidina sobre celulosa microcristalina utiliza solución de ácido fórmico-HCl concentrado-agua (10:1:3) o como alternativa solución de alcohol amílico-ácido acético-agua (2:1:1). También, es posible separar las



antocianinas en TLC sobre mezclas de celulosa y sílica gel usando solventes similares a los que se usa en cromatografía de papel (3).

#### **D. Determinación del valor Rf en cromatografía de papel y en cromatografía de capa fina**

Tanto en la cromatografía de adsorción como en la de reparto de fases es muy importante la relación entre la velocidad de movimiento del soluto y la velocidad de movimiento del disolvente que se usó en el desarrollo, esta relación se calcula mediante la expresión siguiente (50).

$$R_f = \frac{\text{Velocidad de movimiento del soluto}}{\text{Velocidad de movimiento del disolvente}} \quad (\text{II})$$

También puede expresarse de otro modo (33)

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el soluto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}} \quad (\text{III})$$

Para separar los componentes de las antocianinas en cromatografía de papel se puede utilizar los disolventes siguientes: BAW, BuHCl y HCl al 1% en agua. Para separar las antocianidinas se utilizan los disolventes forestal y fórmico (3).

#### **E. Fundamentos fisicoquímicos de la cromatografía de papel**

El método más adecuado para identificar las antocianinas es usando cromatografía de papel (3,50). Con muestras muy pequeñas, microgramos a miligramos, consiste en distribuir de forma diferencial el soluto entre dos fases, inmóvil o estacionaria (papel) hace la función de adsorbente y de soporte, y la otra móvil (disolventes o portadores), teóricamente se considera como si fuera platos en serie en un columna de destilación donde se encuentra el disolvente, donde una porción de la fase estacionaria se pone en equilibrio con la fase móvil, llegando a un equilibrio de reparto de fases entre ellos, la velocidad con que se mueve el soluto depende de su solubilidad relativa en las dos fases denominado "coeficiente de reparto", es la relación que existe entre la concentración del soluto en la fase estacionaria y la fase móvil, cuando alcanza el equilibrio a una determinada:

$$K = \frac{A(\text{Fase móvil})}{B(\text{Fase estacionaria})}$$

Se debe considerar que, el adsorbente, el disolvente y la mezcla de los componentes que se separan por cromatografía interactúan entre sí, esta interacción que hay entre los elementos en el sistema determina el grado de separación de los componentes (50).

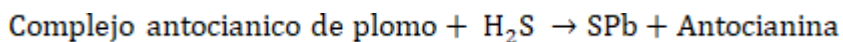
La cromatografía por tanto resulta ser un método fisicoquímico, fundada en la separación de los componentes de una mezcla, por purificación diferencial de solutos, transportadas por una fase móvil (portadores) generalmente está constituido por líquidos con alta presión de vapor y que en determinado momento son retenidas selectivamente por una fase estacionaria inmóvil que puede ser sólida o líquida. El grado de resolución es la mínima distancia a los que pueden hallarse 2 manchas que aún pueden distinguirse individualmente (50).

Aplicar el proceso cromatográfico en papel consiste en calcular el punto de origen de la mezcla donde se hallan las sustancias que se quieren separar, y determinar la longitud de recorrido de la fase móvil visible durante el desarrollo. En cromatografía de papel se usa papel Whatmann de diferente gradación como: Whatmann 1, 2, 3, 3MM, etc. , cuyas medidas superiores pueden ser 50x50 cm y se pueden utilizar toda el área del papel en una cromatocabina y tiras del papel; en cuanto a los solventes estos se seleccionan según su polaridad creciente donde por su constante dieléctrica, el solvente más polar es el agua que tiene 80 de polaridad, el metanol 31, el etanol 26, acetona 21, las menos polares son éter de petróleo y hexano con 1,88, benceno 2,29, éter etílico 4,47, acetato de etilo 6,11, etc. (50).

## **F. Separación de antocianinas y antocianidinas**

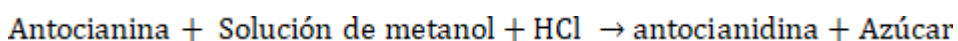
Las antocianinas, se separan del material vegetal por extracción con metanol-HCl, para separar las impurezas del extracto se precipita con acetato de plomo, se forma un complejo de plomo, para liberar las antocianinas del complejo se añade H<sub>2</sub>S (ácido sulfhídrico), generado en un aparato de Kipp, donde se agrega pirita

de hierro  $\text{FeS}_2$  y  $\text{HCl}$  para formar al  $\text{H}_2\text{S}$ . el  $\text{H}_2\text{S}$  al reaccionar con el complejo antocianina de plomo da lugar a la reacción siguiente:



La antocianina libre se filtra para aislarla de los componentes de la solución, se realiza la cromatografía de papel a escala preparativa, luego se corta las tiras, a cada una de ellas se extrae con metanol y se vuelve a realizar la cromatografía de papel. Las antocianinas se identifican determinando los valores  $R_f$  de cada una de ellas (12).

En cuanto a las antocianidinas estas se aíslan por hidrólisis ácida de las antocianinas. Al material vegetal se añade 25mL de alcohol metílico y 3 mL de  $\text{HCl}$  concentrado, se calienta a reflujo por 15 minutos. El proceso es el siguiente:



La solución obtenida se lleva a cromatografía en papel de filtro, en el sistema Forestal:  $\text{HCl}$  concentrado - ácido acético - agua (3:3:10), se obtiene una banda ancha con la que se vuelve a realizar otra cromatografía esta vez en los sistemas forestal ya señalado y fórmico que es una solución de  $\text{HCl}$  concentrado - ácido fórmico - agua (2:5:3), las antocianidinas se identifican determinando los valores  $R_f$  correspondientes (12).

### **1.2.8. Estabilización de las antocianinas**

Las antocianinas son sustancias lábiles, fácilmente se desmejoran con la luz solar, la temperatura, el cambio de pH, la humedad y el tiempo. Con la finalidad de preservar sus características químicas y físicas por un mayor periodo de tiempo conocido como vida útil, se busca estabilizarlos aplicando métodos tales como: spray drying, freeze drying, gelificación iónica, métodos de emulsión, y con agentes estabilizadores usando goma adragante, pectina y otras formas de estabilización como el uso de maltodextrina y goma arábica (29,30).

Otra forma de lograr estabilizar las antocianinas, aunque poco usado porque es un área especializada de los químicos bioinorgánicos, es mediante la formación de complejos de coordinación usando metales atóxicos como el Fe, Mg (51-53), Zn, Cu (24,54-56). Los pigmentos antociánicos hace que el color de las flores, rizomas, frutos, cereales sean diferente uno del otro, se ha revelado que el color azul surge de un complejo de seis moléculas cada una de antocianina y flavona, con un ion férrico, un ion magnesio y dos iones calcio. Donde los iones internos de hierro y magnesio se alinean con tres moléculas de cianidina cada uno de ellas, mientras en la parte externa están los dos iones que se alinean con tres moléculas de flavona cada una de ellas, estas estructuras le dan estabilidad al color (53).

El mecanismo de formación de un complejo de coordinación de antocianinas con un metal atoxico y más bien necesario para el funcionamiento adecuado del organismo caso del magnesio, puede tener lugar al hacer reaccionar la antocianina con óxido de Magnesio de alta pureza en presencia de HCl para formar un quelato, que consiste en que los componentes antociánicos reaccionan con el  $Mg^{++}$  para formar un complejo hexacoordinado de geometría octahedral  $[\eta^6(\text{antocianina})_6\text{Magnesio II}].6\text{Cl}^-$ , donde las antocianinas actúan aportando como ligantes sus pares de electrones libres a los orbitales vacíos del catión  $Mg^{++}$  que se constituirá en la esfera interna de coordinación, mientras los aniones  $\text{Cl}^-$  rodearán la esfera interna constituyendo la esfera externa de coordinación, produciéndose una interacción electrostática permanente entre la esfera interna formada por las cargas positivas del  $Mg^{++}$  y la esfera externa formada por cargas negativas del  $\text{Cl}^-$  (32,33).

Los complejos totales formados se deben hallar a un pH entre 4,5-5 formando agregaciones de pigmentación intermolecular e intramolecular que hacen que se estabilice el color y tenga un alto grado de tinción (43).

En afán de estabilizar los colorantes antociánicos se usa varias sustancias que en mayor o menor medida sirven a obtener la modificación de los colorantes naturales para uso alimentario que no son tóxicas como los colorantes artificiales como citaremos a continuación:

## **A. Maltodextrina**

Es un polisacárido que se elabora por hidrólisis enzimática o ácida parcial usando como materia prima almidón de arroz, maíz, patatas y trigo seguido de su purificación y luego secado por aspersión (57,58). Los fabricantes lo producen convirtiendo el almidón en un polvo inodoro y casi insípido denominado maltodextrina (59), como carbohidrato aporta 4 calorías por gramo de peso según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), por ser un polímero de cadena relativamente corta debería llamarse un oligómero, los productos comerciales contienen menos de 20 unidades de glucosa, entre 3 a 17 unidades de glucosa por cadena (58). Se usa como aditivo alimentario y como aditivo en fármacos como edulcorante y espesante (57,58), Es un ingrediente complementario de edulcorantes como la sucralosa, la estevia. Se mezcla en alimentos como proteínas en polvo, productos horneados, postres congelados, pudines, rellenos, elaboración de tartas, condimentos para alimentos, bebidas deportivas, pero tiene varias contraindicaciones tales como el de incrementar la glucosa en sangre resultando inapropiado su uso para diabéticos porque puede elevar el nivel de glucosa en sangre, una forma de maltodextrina llamada fibersol puede ayudar a prevenir el crecimiento de tumores en células humanas de cáncer de colon (58,60).

## **B. Estabilizadores obtenidos de plantas y animales**

Las plantas contienen pectinas aislada de frutas que actúan como estabilizadores. Son heteropolisacáridos, constituidos por polímeros ácidos y neutros ramificados, se hallan en la lámina media de la pared celular, posee la propiedad de regular el pH y el balance iónico, lo son de 3 tipos: homogalacturonanos, galactorunanos, rhamnogalactorunanos II, están presentes en la guayaba, plátano, pera, durazno, zanahoria y en las hojas de papaya, la pectina se digiere fácilmente en el intestino grueso(61-63), el colágeno es aislado de pieles de animales, es una proteína estructural de la matriz extracelular presente en el tejido conectivo abundante en el cuerpo de los animales, porque actúa en la formación de tejidos: tendones, piel, huesos (64,65), el agar procedente de algas, es un polisacárido ramificado obtenido de la pared celular de las algas del género *Gelidium*, *Euclima* y

Gracilaria (66,67), Lecitina de yema de huevos, semillas de soya, girasol, etc. Son grasas del ácido fosfórico presente en las membranas celulares del que forma parte la cadena empleada en la industria cosmética y alimentaria. Se halla tanto en animales como en vegetales, se separa de la grasa animal, de la yema del huevo y de algunas semillas como soya (68,69).

### **C. Estabilizadores a base de complejo bioinorgánico**

Son aquellos que se forman a base de la interacción de cationes de metales monovalentes, divalentes y trivalentes con estructuras orgánicas como porfirinas, antocianinas, quinonas, etc., siendo importante aquellos formados a base de cationes divalentes como zinc y magnesio dos metales que se encuentran en las células del organismo, el zinc que es necesario para el sistema de defensa del organismo (sistema inmunitario), participa en la división y crecimiento celular, en la cicatrización de heridas y en el metabolismo de los carbohidratos (33).

El magnesio de otra parte es importante porque regula la función de los músculos y el sistema nervioso, los niveles de azúcar en la sangre y la presión sanguínea, ayuda en la formación de proteínas, masa ósea y ADN, es el catión extracelular más abundante en el cuerpo humano catalizador de los sistemas enzimáticos, su falta produce magnesemia que da lugar a la arritmia cardiaca y el síndrome de Gitelman afección del túbulo renal que produce alteraciones metabólicas minerales y del equilibrio ácido-base que se produce por herencia autosómica recesiva una afección genética que pasa de padres a hijos (60,70).

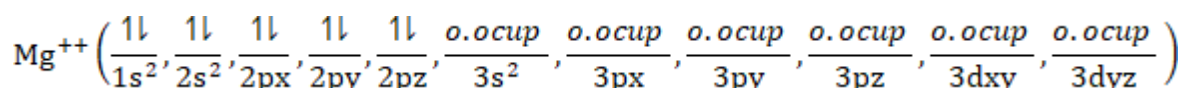
### **D. Complejo de coordinación o quelatos de $Mg^{++}$ con antocianinas**

Los complejos de coordinación constituyen en un tipo especial de isomería, es decir, que teniendo la misma fórmula molecular e igual proporciones de los átomos que conforman la molécula, presentan estructuras químicas distintas, distribución y geometría distinta y, por lo tanto, diferentes propiedades, esa isomería de compuestos inorgánicos y bioinorgánicos se da en mayor número que los que se produce cuando es en compuestos del carbono, en el caso que señalaremos referido a isómeros de coordinación compuestos con coordinaciones

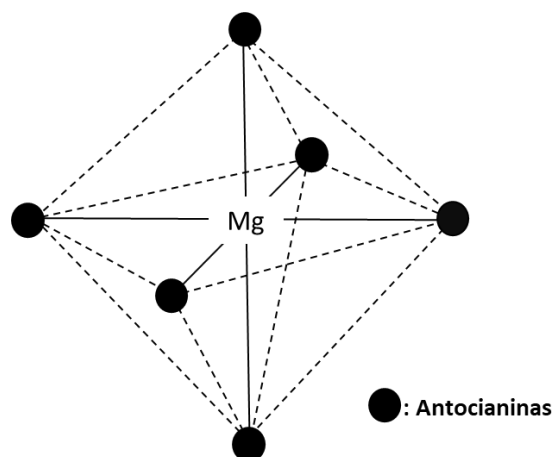
aniónicas y catiónicas, cediendo pares de electrones que se distribuyen entre el catión y el anión y que se denominan ligantes (71).

El magnesio al oxidarse pierde 2 electrones y abre 6 orbitales vacíos para aceptar los ligantes que le aportará los átomos de oxígeno de la antocianina, aquí el magnesio actúa como ion central  $Mg^{++}$  (catión metálico) que posee la tendencia a presentar casi exclusivamente un índice de coordinación de seis y geometría de coordinación octaédrica, contrariamente a otros metales, el magnesio representa un átomo prototipo porque es un ejemplo de interacción con los compuestos orgánicos como lo es en el caso de la clorofila en las plantas que posee una actividad enzimática en reacciones bioquímicas de transferencia de grupos fosfatos y otras reacciones de ruptura no oxidativa de ácidos nucleicos por ribozimas y nucleasas (33), activadoras de enzimas que participan en rutas de importancia biológica, fundamentalmente como la glicolisis, la de los ácidos carboxílicos o la de la síntesis de las pirimidinas (33).

Por eso, el complejo metal antocianina se diferencia sustancialmente de los colorantes sintéticos que solo aportan color y buena presentación a los productos cárnicos, lácteos, grasos, farináceas y a las bebidas, pero sin ningún aporte como coadyuvante de la salud, más bien aportando toxicidad a productos que se usan en la alimentación humana. El ion magnesio para captar los ligantes de las antocianinas apertura 6 orbitales vacíos.

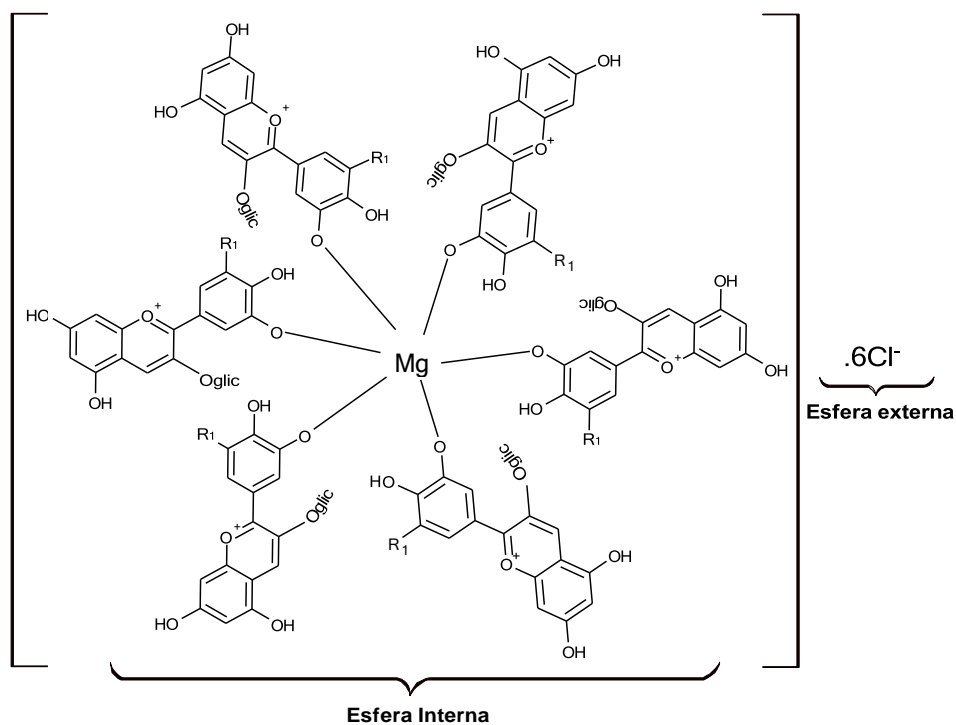


Magnesio (II) con 6 orbitales vacíos que pueden ser ocupados para formar un complejo hexacoordinado de geometría octahedral.



**Figura 5.** Complejo de coordinación o quelato hexacoordinado de geometría octahedral del magnesio con antocianina

Cuando el  $Mg^{++}$  o ion central comparte sus orbitales vacíos  $3s^2$ ,  $3p_x$ ,  $3p_y$ ,  $3p_z$  y 2 orbitales como  $3d_{xy}$  y  $3d_{yz}$  se halla expedito para formar con las moléculas de antocianinas que aportan un par de electrones de sus átomos de oxígeno como ligantes para la formación del complejo de coordinación con un índice de coordinación seis y geometría de coordinación octahédrica, se forma un isómero que nos es común en la química del carbono (71), esto quiere decir que el ion  $Mg^{++}$  puede ligarse con 6 moléculas de antocianinas para formar el complejo  $[\eta^6(\text{antocianina})_6\text{Magnesio II}].6\text{Cl}$



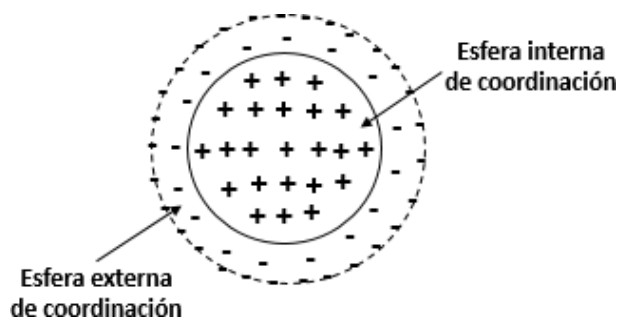
**Figura 6.** Estructura del  $[\eta^6(\text{antocianina})_6\text{Magnesio II}].6\text{Cl}^-$



Ligazón conocida de como: seis hapto porque liga con orbitales sigmas sp mas no con orbitales p; que formaría orbitales moleculares  $\pi$  ( $\pi$ )

Cada oxígeno del sustituyente fenólico de las moléculas de antocianinas aporta un par de electrones conocido como ligante, que ocupan los orbitales vacíos del  $Mg^{++}$  para formar una esfera interna de coordinación mientras el anión cloro ( $Cl^-$ ) que participa en la formación del complejo de coordinación interactúa con las capas positivas del catión  $Mg^{++}$ , ocurriendo la siguiente reacción:  $MgO + 6HCl \rightarrow Mg^{++} + 6Cl^- + H_2O$ .

El anión cloro ( $Cl^-$ ), rodea a la llamada esfera interna de coordinación y como tal forma una estructura como la siguiente.



**Figura 7.** Esfera interna y externa de coordinación del complejo

De este modo al llenarse la esfera interna de coordinación rodeando a ésta se encuentra los aniones  $Cl^-$  produciéndose una interacción electrostática de cargas positivas con cargas negativas. Este producto es una derivatización de la antocianina, un complejo bioinorgánico tratando de imitar de algún modo a la clorofila que es un producto metabólico relevante de la vida vegetal y de la supervivencia de las especies animales y del ser humano (33).

### 1.3. Definición de términos básicos

**El magnesio.** Es un metal divalente que desempeña un papel vital en muchos procesos celulares, en una serie de actividades metabólicas, está asociado a una variedad de enzimas que controlan el metabolismo de los carbohidratos, proteínas, grasas y los electrolitos. Varios cientos de enzimas dependen directa o

indirectamente del magnesio. Entre ellas, las más importantes son las que hidrolizan y transfieren grupos fosfato, incluidas las enzimas que intervienen en las reacciones de producción de energía y ATP (70,72). El magnesio como metal tiene la propiedad de formar con los átomos de otras moléculas complejos hexacoordinados  $sp^3d^2$ , con una geometría octaedral (33).

**Compuestos de coordinación.** Son complejos isoméricos formados por un átomo o ion central (generalmente un metal) que posee orbitales libres para aceptar pares de electrones o ligantes de los átomos de otro compuesto que forma parte del complejo y que adopta innumerables formas geométricas (33,73).

**Antocianinas.** Son moléculas polifenólicas derivadas de 2-fenil-cromano (41), se encuentran en todas las plantas vasculares (3) son responsables de la adaptabilidad de las plantas al medio ambiente donde se desarrollan (40), son una clase de compuestos heterocíclicos denominados flavonoides que son solubles en agua, intervienen en la formación del color, las antocianinas más comunes son: cianina, delphinina, pelargonina, petunina, malvina y peonina (3).

**Antocianidinas.** Son compuestos que se forman biosintéticamente a partir de los flavanones por saturación de estos en posiciones 1 y 2, 3 y 4 y se denominan Cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina, petunidina y pelargonidina (3,41,46).

## CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

### 2.1. Formulación de la hipótesis

Los pigmentos antociánicos que contiene el tubérculo de *D. trifida* L (sachapapa morada) pueden identificarse por cromatografía de papel y estabilizarse por acoplamiento con magnesio y por intervención del ácido clorhídrico formándose isómeros denominados complejos de coordinación.

### 2.2. Variables de estudio y su operacionalización

#### 2.2.1. Variable de estudio

**Presencia de antocianinas.** Pigmentos presentes en *D. trifida* L.

**Caracterización.** Es la identificación de los pigmentos de *D. trifida* L. por cromatografía de papel.

**Estabilización de antocianinas.** Los pigmentos son estabilizados cuando se forman complejos de coordinación por acoplamiento de las antocianinas con el magnesio en medio ácido.

## 2.2.2. Operacionalización de variables

Variable de estudio	Definición operacional	Tipo por naturaleza	Indicadores	Escala de medición	Categoría	Valores de las categorías	Medios de verificación
Presencia de pigmentos antocianidos en <i>D. trifida</i> L	Los colorantes obtenidos de los tubérculos de <i>D. trifida</i> L., fueron extraídos con metanol y HCl al 1%, estos pigmentos son la mezcla de varias antocianinas. Para obtener las antocianidinas, el extracto metanólico fue hidrolizado con ácido clorhídrico al 1% obteniéndose las correspondientes agliconas.	Cualitativa	Extracto pigmentado	Nominal	Ninguna	Ninguna	Registro de la solución de color violeta oscuro.
Caracterización	Para identificar las antocianinas se realizó una corrida en cromatografía de papel, utilizando como solvente resolución los sistemas BAW (n-butanol-ácido acético-agua) y HCl al 1%. Para identificar las antocianidinas por cromatografía de papel se usó como solventes de resolución el sistema forestal y fórmico.	Cuantitativa	Valor Rf x100 en BAW Valor Rf x100 en HCl 1%  Valor Rf x100 en Forestal Valor Rf x100 en fórmico	Razón Razón  Razón Razón	Ninguna Ninguna  Ninguna Ninguna	Ninguna Ninguna  Ninguna Ninguna	Registro de cromatografías en papel.  Registro de cromatografías en papel.
Estabilización de antocianinas	La muestra del pigmento líquido se hizo reaccionar con HCl y MgO formando complejos de coordinación con las antocianinas presentes.	Cuantitativa	Color estable	Razón	Ninguna	Ninguna	Registro de datos en el potenciómetro

## **CAPÍTULO III: METODOLOGÍA**

### **3.1. Diseño metodológico**

El tipo de investigación fue analítico, porque incidió en el análisis comparativo de los resultados obtenidos con los que describe la literatura en estudio realizados con otras plantas cuyos componentes son de naturaleza antocianica.

El diseño es experimental porque las variables de estudio se manipulan y se realizan modificaciones en su estructura original, pero la muestra no se toma aleatoriamente tampoco los resultados obtenidos, dado al grado de exactitud y precisión de los equipos de medición (74).

Este proceso experimental sigue un diseño algorítmico, es decir, que se establece un conjunto de operaciones y procesos que señalan los caminos críticos que se debe recorrer hasta su concreción final.

### **3.2. Diseño muestral**

En este trabajo no se precisa diseño muestral, no se necesita esquema de muestreo a utilizar, ni es necesario determinar el tamaño y procedimiento de selección y distribución de la muestra, tampoco el muestreo es probabilístico para determinar y estimados ya que el órgano de la planta (tubérculo) que se toma como material de estudio tiene los mismos componentes en cada uno de las unidades que forman el conjunto de la muestra que se toma para el estudio, de suerte que no requiere de un diseño aleatorio de otro lado las mediciones que se hacen de la materia prima y del producto que se obtuvo son invariablemente idénticos y se miden con alta exactitud y precisión que no se observa variaciones o sesgos.

### **Población de estudio**

Está constituido por tubérculos de la especie vegetal *D. trifida* L. (sachapapa morada) de cultivares del centro poblado de Nuevo Oriente, Distrito de Mazan, Provincia de Maynas, Región Loreto.

### **Tamaño de la muestra**

Se recolectó 1kg de tubérculos de *D. trifida* L. para el estudio.

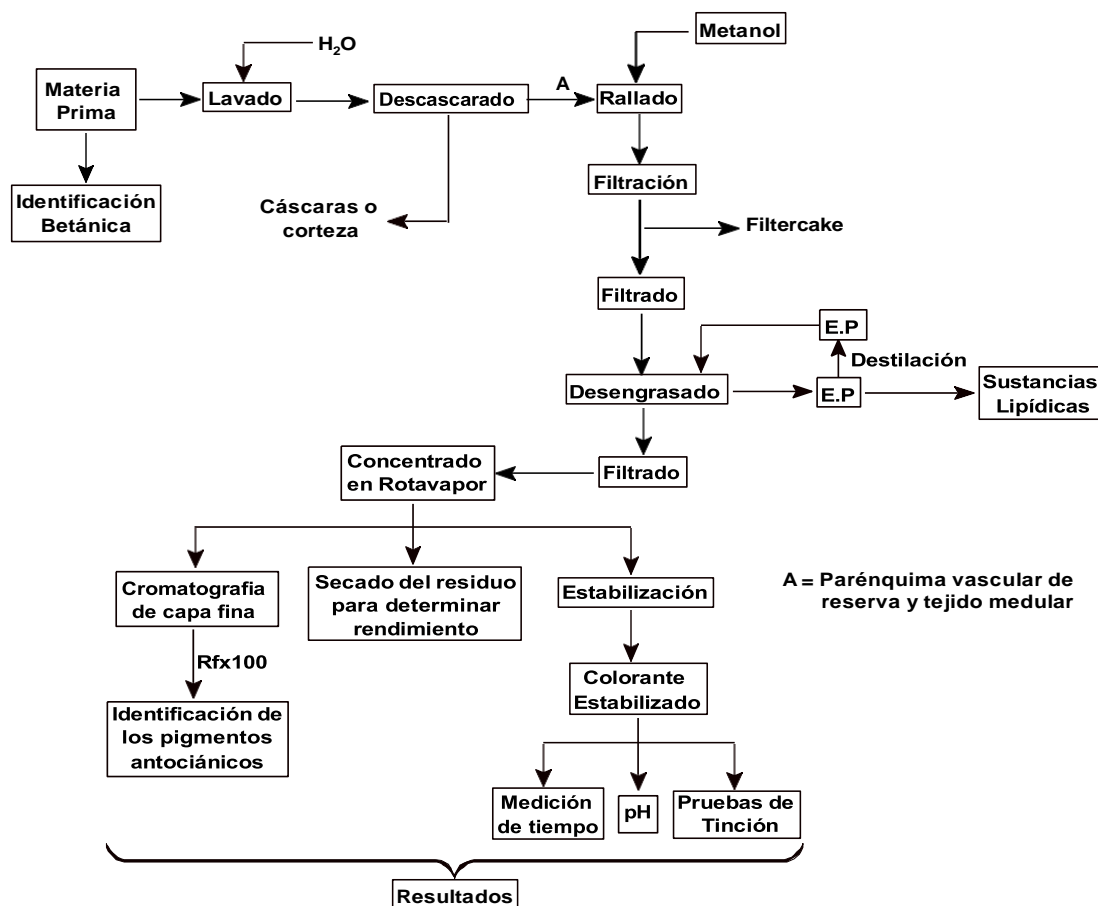
### **Criterio de selección**

**Criterios de inclusión:** se seleccionaron tubérculos con mayor desarrollo, sanos y grandes.

**Criterios de exclusión:** se descartaron tubérculos atacados por hongos que pudieran desnaturalizar las antocianinas.

### **3.3. Procedimiento de recolección de datos**

Se diseñó un conjunto de pasos en una secuencia ordenada como requiere seguir para la identificación de los pigmentos y los procesos que se sigue en la estabilización de los pigmentos (ver diagrama de bloque).



**Figura 8.** Diagrama de bloques del estudio identificación y estabilización de antocianinas de *D. trifida* L

**A.1. Recolección de la muestra vegetal,** La muestra de *D. trifida* L. se recolectó en los cultivos del centro poblado de Nuevo Oriente, distrito de Mazan, provincia de Maynas, Región Loreto. Ubicada entre las coordenadas georreferenciales 3°,13',33" Sur y 73°,10',02" Oeste, altitud 108 msnm.

Se procedió a desenterrar y seleccionar los tubérculos de 3 plantas y se colocó en una bolsa de plástico y se llevó al laboratorio de fitoquímica y productos naturales de la facultad de Ingeniería Química de la UNAP. Se tomó fotografía de la planta, para documentar el estudio, se cortó un trozo de liana con hojas y el tubérculo y se llevó al Herbarium amazense CIRNA-UNAP para su identificación botánica.

**A.2. Certificación de la especie,** la planta con el tallo (liana), hojas y tubérculo fue identificado en el Herbarium Amazonense CIRNA-UNAP, por el especialista

en taxonomía vegetal expidiéndose la constancia de certificado de la especie vegetal como *D. trifida* L (ver anexo 1).

**A.3. Lavado**, en el laboratorio los tubérculos de sachapapa morada fueron lavados con abundante agua corriente y agua destilada para eliminar la tierra y adherencias en la corteza o cáscara.

**A.4. Descascarado**, con un cuchillo se quitó la cubierta externa conocido como periderma, dejando libre el córtex, el tejido vascular u cambium y la medula, zonas del tubérculo (zona subterránea) donde se halla fijado el colorante sobre un cuerpo farináceo.

**A.5. Rallado y extracción**, el córtex, el tejido vascular, el cambium y la médula se pasan por un rallador fino, las partículas se recogen en un vaso de vidrio, de cual se tomó 0,5kg y se agregó 600mL de metanol y gotas de HCl.

**A.6. Filtración**, la mezcla sólido-líquida se filtró utilizando un embudo Buchner acoplado a un matraz de Kitasato y haciendo vacío con bomba de 0,1 millitorr. Se lavó el filter cake (afrecho) con metanol para agotar el colorante que puede estar todavía retenido en la torta, se obtuvo un filtrado de 600mL de color púrpura.

**A.7. Desengrasado**, el filtrado se trasvasó a un embudo de separación de 2 litros, se agregó éter de petróleo y se agitó por ½ hora, se separó la fase sobrenadante a base de éter de petróleo y los lípidos extractados que se hallaban en el filtrado original. Se tomó el filtrado desengrasado constituido por la capa inferior que es la capa acuosa-metanólica que contiene el colorante. Se calentó levemente a 70°C para eliminar el remanente de éter.

**A.8. Concentración**, la solución metanólica-acuosa se concentró a 1/6 de su volumen en rotavapor a 35°C de temperatura a fin de evitar la desnaturalización del colorante hasta obtener 120mL de concentrado se repartió del modo siguiente: 50mL para realizar la cromatografía de papel para determinar las antocianinas y antocianidinas, 20mL para determinar el colorante total como extracto seco



(rendimiento), 50mL de solución para las pruebas de estabilización del colorante con MgO y HCl.

**A.9. Determinación de la humedad**, se tomó 5g de *D. trifida* L., se cortó en trocitos se puso en una cápsula metálica de fondo plano y se llevó a la estufa a 100°C por 3 horas. Se retiró la cápsula de la estufa y se dejó enfriar en un desecador de vidrio, cuando estuvo a la temperatura ambiente de 30°C se volvió a introducir la cápsula dentro de la estufa, manteniéndose en ella ½ hora y se pesó obteniéndose un peso constante que indicó que eso es el valor de humedad relativa (anexo 3).

**A.10. Secado**, se tomó el extracto de 20mL y se llevó a un vaso de precipitado de 100mL se calentó en un calentador con control reostático a una temperatura de 68°C hasta sequedad para no desnaturalizar el calor, se dejó enfriar y luego con una pequeña espátula se quitó el sólido adherido al vaso, se trituró en un mortero y se pesó en balanza analítica, ver cálculos (anexo 3).

**A.11. Separación de antocianinas del colorante por cromatografía de papel y su identificación**, se tomó 20mL del concentrado de *D. trifida* L (sachapapa morada) y se añadió unas gotas de ácido clorhídrico concentrado, luego fue llevada a cromatografía preparativa o de purificación en una lámina de papel Whatmann de 50cm largo por 25 de ancho se aplicó la solución sobre el papel a 10cm del origen para luego ser introducido en la artesa cuidando de que el origen de la muestra este a 2cm libre de la artesa y se corrió en forma descendente por 12 horas, se usó como solventes de resolución HCl al 1% y BAW y se determinó los valores de Rf de las 4 franjas que se resolvieron en ambas laminas (ver anexo 4).

**A.12. Identificación de las antocianidinas por cromatografía de papel**

**Hidrólisis ácida de las antocianinas de *D. trifida* L para obtener en forma de antocianidinas (agliconas)**

Se tomó 50mL de extracto metanólico y se agregó 6mL de ácido clorhídrico concentrado, se llevó a un destilador de reflujo y se calentó por 20 minutos a

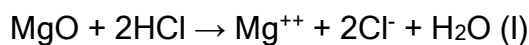
70°C. La solución obtenida fue llevada a cromatografía preparativa o de purificación en una lámina de papel Whatmann de 50cm largo por 25 de ancho en forma descendente se aplicó la solución sobre el papel a 10cm del origen para luego ser introducido en la artesa cuidando de que el origen de la muestra este a 2cm libre de la artesa y se corrió por 20 horas en forestal una solución a base de HCl concentrado – ácido acético – agua (3:3:10) dio como resultado una banda ancha de color púrpura.

Esta banda se cortó se picó en pequeños trocitos y se extrajo con metanol y se filtró en un Buchner para después pasar por bomba de vacío a fin de conseguir mayor cantidad de colorante, la solución metanólica colorida se repartió en dos alícuotas se aplicaron las soluciones sobre 2 papeles de filtro de 50x25cm y se recromatografiaron también en forma descendente aplicando nuevamente el sistema forestal y el sistema fórmico que es una mezcla de HCl concentrado - ácido fórmico - agua (2:5:3) se obtuvieron 4 bandas a los que se les determino el valor de Rf para establecer comparación con los valores de la literatura (ver anexo 5).

### A.13. Estabilización del colorante

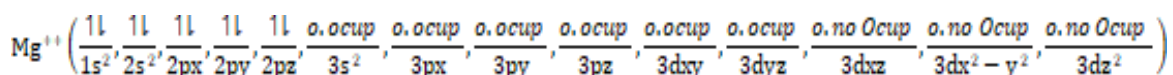
Para estabilizar las antocianinas se hizo la reducción del ion flavilo, mediante la reacción de óxido de magnesio con HCl en solución metanólica acuosa, la reacción es la siguiente:

1er paso: Reacción de MgO con HCl



2do Paso: el cloro de la reacción (l) en forma de 2 Cl<sup>-</sup> (anión) va formar la esfera externa de coordinación del complejo de coordinación de la antocianina que actúan como ligante del catión Mg<sup>++</sup>.

3er paso: el magnesio como catión Mg<sup>++</sup> toma la forma siguiente:



Forma que toma los orbitales del catión magnesio

Pero debemos señalar que el  $Mg^{++}$ , presenta casi exclusivamente un índice de coordinación de seis, esto quiere decir adopta 6 orbitales vacíos para aceptar 6 ligantes, dado por 6 pares de electrones de 6 moléculas de antocianinas para formar los complejos hexacoordinados con una geometría octahédrica (33). El magnesio cuando se oxidó por acción del HCl perdió un par de electrones del orbital 3s, y abrió 5 orbitales ocupables que son  $3p_x$ ,  $3p_y$ ,  $3p_z$ ,  $3d_{xy}$ ,  $3d_{yz}$  siendo los orbitales  $3d_{xz}$ ,  $3d_{x^2-y^2}$  y  $3d_z^2$  no ocupables, que permitirán la formación del complejo de coordinación.

El magnesio con los 6 ligantes aportados por 6 moléculas de antocianinas representa la esfera interna de coordinación, mientras los iones  $Cl^-$  (aniones) rodeando al magnesio y las antocianinas forma la esfera externa de coordinación.

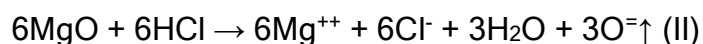
#### **A.14. Procedimiento para la obtención del complejo de estabilización de las antocianinas de *D. trifida* L**

Este proceso es una reacción de derivatización de 6 antocianinas con el magnesio y el cloro para formar en un quelato o complejo de coordinación

##### **Base de cálculo**

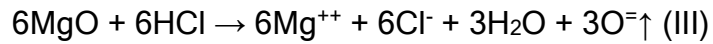
Se tomó 40mL de extracto metanólico del tubérculo de *D. trifida* L que equivale 0,61g del extracto seco para realizar las pruebas de estabilización (ver anexo 6).

Procedimos a establecer la relación estequiométrica basado en la ley de Proust o Ley de Las Proporciones definidas, se usó MgO y HCl como los reactantes. Procedimos a obtener una solución iónica de  $6Mg^{++}$  y  $6Cl^-$  del modo siguiente:



Estequiométricamente esta reacción ponderal expresa las relaciones cuantitativas que se establecen entre estas sustancias que con sus respectivos pesos intervienen en la reacción tal como expresamos en II:

Donde  $6MgO + 6HCl$  son los reactantes y  $6Mg^{++} + 6Cl^- + 3H_2O + 3O^{\equiv\uparrow}$  son los productos obtenidos, y expresados en peso molecular (ver anexo 6).



Nótese que la flecha en  $3\text{O}^{\uparrow}$ (gas) indica que es volátil

De acuerdo con la ley de conservación de la masa, la masa de los reactantes debe ser igual a la masa de los productos que se formaran. Para trabajar con masas más pequeñas se procedió a dividir con la masa del magnesio todas las masas de otras sustancias involucrados en la reacción (ver anexo 6)

Pero se debe distinguir que el HCl actuará en las reacciones como reactante líquido para llevar su volumen a masa para así conocer su densidad a fin de considerarlo en peso (g), la densidad del ácido es 1,164g/mL, pero estos cálculos se pueden observar en el anexo 6.

De estos productos solo son significativos  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Cl}^-$ ;  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}^-$  no van a intervenir en la reacción. Esta solución iónica reaccionará con la antocianina para formar el producto, como se muestra en la siguiente reacción, para calcular la masa de antocianina que interviene en la reacción se tomó como base de cálculo, la masa del magnesio que es el reactivo limitante.

Una vez obtenida la reacción iónica, el  $\text{Mg}^{++}$  y el  $\text{Cl}^-$  se convierten en reactantes que van a reaccionar con las antocianinas para dar un producto según la reacción siguiente:



Producto:  $[\eta^6(\text{antocianina})_6\text{Mg}(\text{II})].6\text{Cl}^-$  o  $[\text{hapto}^6(\text{antocianina})_6\text{Magnesio}(\text{II})].6\text{Cl}^-$   
(ver cálculo anexo 6)

### **3.4. Procesamiento y análisis de datos**

#### **3.4.1. Identificación de los componentes antociánicos por cromatografía de papel monodimensional**

Se obtuvo 4 antocianinas utilizando cromatografía de papel monodimensional descendente con solventes como BAW y HCl al 1% (fase móvil). Se usó láminas de papel Whatmann de dimensiones 50x25cm (fase estacionaria). Se midieron las

distancias que ha recorrido la mancha (spot) del soluto en cm y la distancia que ha recorrido el eluyente denomina frente del solvente del punto de origen desde el cual se inició la corrida, con estos datos se determinaron los valores Rf correspondientes de las antocianinas separadas del extracto colorido (ver anexo 4); la fórmula es el siguiente (50).

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el soluto (cm)}}{\text{Distancia recorrida por el solvente (cm)}}$$

### **3.4.2. Identificación de las antocianidinas por cromatografía de papel monodimensional**

Se obtuvo 4 agliconas utilizando cromatografía de papel monodimensional descendente con solventes el sistema forestal: ácido clorhídrico concentrado - ácido acético - agua y fórmico: ácido clorhídrico concentrado - ácido fórmico - agua respectivamente. Se usó láminas de papel Whatmann de dimensiones 50x25cm. Se midieron las distancias que han recorrido las manchas (spots) del soluto en cm y la distancia que ha recorrido el eluyente denomina frente del solvente desde el origen punto de inicio de la corrida con estos datos se determinaron los valores Rf correspondientes a las antocianidinas presentes en el extracto (ver anexo 5); se usó la misma fórmula anteriormente indicada en 3.4.1. para determinar Rf de las antocianidinas (50).

### **3.4.3. Estabilización de las antocianinas**

Para estabilizar los colorantes antociánicos presentes en el extracto se usó ácido clorhídrico y óxido de magnesio en solución metanólica acuosa, la reacción del óxido de magnesio con ácido clorhídrico formó solución iónica de  $Mg^{++}$  y  $Cl^-$ , el ion magnesio utiliza 6 orbitales vacíos para formar la esfera interna de coordinación del complejo y el ion cloro actúa rodeando la esfera interna y forma la denominada esfera externa de coordinación del complejo, cuya estructura al ligar con seis moléculas de antocianinas a través de sus oxígenos forma el complejo hexacoordinado de geometría octaédrica (33).

#### **3.4.4. Determinación de pH**

Se preparó con el complejo sólido obtenido una solución al 10% diluyendo en 25mL de agua destilado. Se tomó el potenciómetro digital Baltalab, se introdujo el electrodo en la muestra y la lectura arrojó un pH ácido, medición que es directa e instantánea.

#### **3.4.5. Cálculo de la estabilidad del colorante en función de la absorbancia Vs el tiempo**

Se determinó en el equipo de espectrofotometría Único 2800, midiendo la absorbancia a una longitud de onda máxima de 520nm de una solución del complejo formado, el día de la síntesis y luego, a los 4 meses, 6 meses, 8 meses y 10 meses respectivamente tiempos que se hallan en el límite del desarrollo del estudio con los que se realizó su proyección, hasta 36 meses (3 años) usando el método estadístico de Mínimos cuadráticos (75). Tomando la absorbancia de 2 a un tiempo cero y variaciones mínimas de esta absorbancia hasta el décimo mes los sucesivos meses fueron calculados mediante la ecuación de la recta:

$$y = a + mx$$

Con cuya expresión se calculó el intercepto "a" y la pendiente "m", valores que sirvieron para determinar las variaciones que sufre la absorbancia en función del tiempo transcurrido hasta el 36 mes (3 años) en que se observa una mínima variación de la absorbancia de 0,1 en el primer valor decimal de la absorbancia que consideramos significativa para establecer el límite del tiempo conocido como vida útil, los datos medidos con los que se proyectó el tiempo de vida útil del colorante se muestran en el (anexo 7)

#### **3.5. Aspectos éticos**

La recolectó tubérculos maduros que cumplieron el ciclo de desarrollo de la planta. En cuanto al uso de reactivos para la experimentación, se usó cantidades muy pequeñas que los residuos generados no afectaron al medio ambiente. Además, estos reactivos se han transformado en productos con las que perdieron su capacidad tóxica, convirtiéndose en inofensivos para el medio ambiente y la

salud humana. De otro lado, no se realizó pruebas biológicas en animales y tampoco en seres humanos.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS.

### 4.1. Rendimiento de antocianinas

Se logró extraer 9g de colorante, que representó un rendimiento porcentual de 6% (ver anexo 3).

### 4.2. Características fisicoquímicas: comportamiento de las antocianinas según el sistema de solventes

**Antocianinas:** Corridas en cromatografía de papel

Antocianinas	Valores Rf x 100			
	De <i>D. trifida</i> L.		Muestra estándar	
	BAW	HCl 1%	BAW	HCl 1%
Cianina	37	19	37(3)	19 (3)
Malvina	31	22	31 (6)	22 (49)
Peonina	23	17	23 (6)	17 (5)
Pelargonina	32	23	32(3)	23 (3)

BAW: [n-butanol-ácido acético-agua], (cálculos ver anexo 4)

**Antocianidinas:** corrida en cromatografía de papel

Antocianinas	Valores Rf x 100			
	De <i>D. trifida</i> L.		Muestra estándar	
	Forestal	Fórmico	Forestal	Fórmico
Cianidina	49	22	49 (3)	22 (3)
Malvidina	60	27	60 (3)	27 (3)
Peonidina	29,5	30	29,5 (3)	30 (3)
pelargonidina	68	33	68 (3)	33 (3)

Forestal: [HCl concentrado-ácido acético-agua]

Fórmico: [ácido clorhídrico concentrado-ácido fórmico-agua]  
(cálculos ver anexo 4)

### 4.3. Colorante de *D. trifida* L. estabilizado



**Tabla 5.** Características del colorante estabilizado de *D. trifida* L.

Nombre	Color del complejo	pH	Solubilidad	Peso obtenido	Vida útil estimada
$[\eta^6(\text{antocianina})_6\text{Mg II}].6\text{Cl}^-$	Azul intenso	3,78	En etanol y agua	2,086	36 meses

## CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

*Dioscorea trifida* L. es una especie que crece en regiones tropicales (9,76-78) y subtropicales (5). Es utilizada por su valiosa propiedad nutricional por el alto contenido de carbohidratos que posee (84%) (77,79), debido a ello se pretendió sustituir parcialmente a la harina de trigo para elaborar panes que no contengan gluten nocivo para el revestimiento del intestino delgado y produce el esprúe celiaco (8,9,78); pero mayor aun es su importancia por el contenido de pigmentos antociánicos (6,76) que le conceden propiedades benéficas para la salud humana por su alta capacidad antioxidante que evita el estrés metabólico que induce cáncer (20,78,80-82).

Para extraer el colorante matriz de una especie vegetal, es usada diferentes tipos de solventes y diferentes técnicas para aislarlos y purificarlos sus componentes, entre ellas se tiene cromatografía de papel, de capa fina, cromatografía de gases, HPLC, etc. (82). De *D. trifida* L. de Venezuela fue extraído 53mg de antocianina en 100g/100 de extracto, y por intercambio catiónico fue aislado y purificado cada componente antociánico (6). En nuestro estudio se extrajo 9g de colorante en 150g de muestra, pero el aislamiento y purificación se hizo por cromatografía de papel donde se identificó 4 antocianinas.

Asimismo, Alberca (7) extrajo 253,584mg de antocianinas totales por cada 100g de muestra húmeda, pero no logró identificar los componentes que posee el colorante. En otro estudio, el colorante de *D. trifida* L. fue extraído por atomización, pero los componentes presentes en ella no fueron aislados ni identificados (2), en estos dos estudios solo se limitaron a extraer el colorante, mientras que en nuestro estudio se aisló e identificó los componentes presentes del colorante. Por otra parte, el colorante de *D. trifida* L fue extraído en forma de pasta (77), también fue extraído almidón de color por la presencia de antocianinas (76), pero no fue aislado ni cuantificado el contenido de antocianinas. En estos estudios no se separó el colorante matriz menos sus componentes, solo se obtuvo una pasta con contenido de almidones y otros componentes incluido los colorantes antociánicos, mientras que, en el trabajo que se realizó se extrajo el

colorante matriz de *D. trifida* L. y se cuantificó. Además, se identificó sus componentes y se estabilizó el colorante. De otra parte, las antocianinas también fueron extraídos de otras especies de *Dioscorea* tales como *Dioscorea alata* L. del que fue extraído 282g de colorante que representa el 5,22% de rendimiento, relativamente menor el rendimiento del colorante respecto a *D. trifida* L (82).

En lo referente al aislamiento y purificación de compuestos antociánicos, en *D. trifida* L. de la amazonia peruana se aisló cuatro antocianidinas que proceden de las agliconas de cianidina, peonidina, malvidina y pelargonidina, así como cuatro antocianinas: cianidina-3-rhamnosil-glucósido, peonidina-3,5-diglucósido, malvidina-3,5-diglucósido y pelargonidina-3,5-diglucósido. Sin embargo, en *D. trifida* L de Venezuela se aisló tres antocianinas una que procedía de las agliconas de peonidina y dos que procedían de malvidina (6). Además, de la especie procedente del valle del alto Huallaga Tingo María (Perú), fue aislado doce antocianinas, estas antocianinas proceden de las agliconas de cianidina, peonidina y pelargonidina (5). Estos estudios muestran que, una misma especie difiere en la producción de metabolitos secundarios, estas diferencias básicamente pueden estar relacionados a las condiciones medioambientales (20,38,83,84), presencia de metales que toma la planta del suelo, por proceso de copigmentación intramolecular, rotación y degradación (43).

En *D. trifida* L. de Filipinas fue aislado ocho antocianinas, de los cuales cuatro son aciladas de tipo cianidina y peonidina y los cuatro restantes son desconocidos (82). Asimismo, de cepas de *D. alata* L procedente de Tailandia fue identificado 11 antocianinas, cuatro son cianidinas glucosiladas, cinco son de tipo alatanina B, C, G, E y un isómero de E y dos desconocidos (85). De *D. trifida* L. y la especie *D. alata* L. difiere en cuanto a la producción de componentes antociánicos que posee, como ya se señaló anteriormente, estas diferencias pueden estar influenciados a las condiciones medioambientales donde se desarrollan.

En *D. trifida* L. de la amazonia peruana se identificó cuatro antocianinas mediante la determinación de sus valores R<sub>f</sub>100 por cromatografía de papel corridas en sistemas BAW y en ácido clorhídrico al 1% estos son: cianidina-3-rhamnosil-glucósido, peonidina-3,5-diglucósido, malvidina-3,5-diglucósido y pelargonidina-

3,5-diglucósido, mientras que, de *D. trifida* L. procedente de Venezuela fue identificado tres antocianinas tales como peonidina-3,5-diglucosido, malvidina-3,5-diglucosido y malvidina-3,5-diglucosido-ácido ferúlico (6), de estos tres solo dos componentes antociánicos fueron similar al de nuestro estudio. Se observa que, la presencia de la molécula compleja malvidina-3,5-diglucosido-ácido ferúlico encontrada como pigmento antociánico evidencia la variación intraespecífica de los componentes que posee una misma especie vegetal según el lugar donde crece, a pesar de ser una misma especie. Además, la especie que crece en Venezuela no contiene cianina ni pelargonina. Esta variabilidad puede estar ligada a las condiciones medio ambientales y a la variabilidad genética de la especie (20,38,83,84). Por otra parte, la concentración de compuestos antociánicos está relacionado con el ciclo de desarrollo del tubérculo (estado de madurez) (20,22), condiciones estacionales, y que la luminosidad y temperatura son las principales variables ambientales que regulan la síntesis de estos compuestos (20).

En *D. trifida* L procedente del alto Huallaga (Perú), fue identificado doce antocianinas por HPLC-DAD-ESI/MS tales como: cianidina-3-O-glucósido-5-O-glucósido, pelargonidina-3-O-glucósido-5-O-glucósido (pelargonidina-3,5-diglucósido), peonidina-3-O-glucósido-5-O-glucósido, peonidina-3-O-glucósido, cianidina-3-O-P-cumaroil-glucósido-5-O-glucósido, antocianina-acilada, pelargonidina-3-O-P-cumaroilglucósido-5-O-glucósido, peonidina-3-O-feruloilglucósido-5-O-glucósido, petunidina-3-O-P-cumaroilglucósido-5-O-glucósido, antocianina acetilada y un derivado de la peonidina (5), como se podrá observar de estos resultados, once compuestos están bien identificados, pero un compuesto es señalado como derivado aislado de la peonidina quiere decir que tiene una estructura molecular incierta eso se debe al producto de la copigmentación intramolecular (43), las moléculas de azúcar en la posición 3 de las antocianinas se agregan otras sustancias, como cafeatos, ácido ferúlico o grupos acilos parecidos, que al pasar por el espectro de masas al ionizarse sufre una ruptura múltiple y resulta complicado su recomposición Mc-Lafferty, caso de las antocianinas azul celeste (43).

El color que muestran las flores, granos, tubérculos y otros órganos de un vegetal a excepción de los centrospermeae donde están presentes betalainas (3) se debe

a la presencia de compuestos antociánicos, cuando son extraídos del material vegetal se desmejoran con mucha facilidad por varios factores tales como exposiciones a la luz, temperatura, oxidación, etc., a la fecha se ha realizado varios intentos de estabilizar estos colorantes con la finalidad de prolongar su vida útil de modo que pueda definitivamente reemplazar a los colorantes sintéticos tóxicos en la tinción de alimentos

Para lo cual se han buscado compuestos naturales estabilizadores, tales como compuesto de inclusión que actuarán como hospedero, mientras que el colorante es meramente un huésped se conoce como proceso de encapsulamiento y, la segunda mediante la formación de complejos de coordinación con iones metálicos divalentes o trivalentes, que forman un solo cuerpo molecular de estructura bioinorgánica también denominados quelados en la que una o varias moléculas orgánicas rodean y se enlazan a un ion metálico obteniéndose su estabilización y alargando su vida útil (33).

El complejo antociánico del catión  $Mg^{++}$  hexacoordinado rodeado del anión  $Cl^-$  en número de 6 que obtuvimos se denomina  $[\eta^6(\text{antocianina})_6\text{Magnesio (II)}].6Cl^-$ , porque el magnesio reacciona con orbitales  $\sigma$  (sp-sp) de grupo fenólico de la antocianina; mas no con los orbitales atómicos  $\pi$  (p-p) que forman orbitales moleculares  $\pi$  porque la reacción no tiene lugar con los dobles enlaces conjugados del benceno o del cromano. La postulación de esta estructura molecular obtenida está basada en las consideraciones estequiométricas de los reactantes impuestos por los orbitales que serán ocupados por 6 pares de ligantes y dan lugar a la estructura  $sp^3d^2$  hexacoordinado y que configuran una estructura geométrica octahedral. Ya que no se dispone de un equipo de resonancia paramagnética electrónica (EPR), resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas; la postulación de la estructura se basa en las teorías de la formación del complejo de modo que la estabilización del colorante extraído de *D. trifida* L se realizó por derivatización del colorante mediante una reacción estequiométricamente balanceada que genera un complejo de coordinación hexacoordinado de estructura octahedral que denominamos  $[\eta^6(\text{antocianina})_6\text{Magnesio (II)}].6Cl^-$ ; cuya fórmula se dedujo en función de la participación de cada componente de la reacción y el comportamiento del ion

magnesio como dador de orbitales  $sp^3d^2$  (33), que además del orbital  $3s^2$  vacío, cuando se transforma en  $Mg^{++}$ , apertura los orbitales  $3p_x$ ,  $3p_y$ ,  $3p_z$ ,  $3d_{xy}$  y  $3d_{yz}$  para que los ligantes llenen estos orbitales vacíos para formar el complejo antocianina y hexacoordinado de estructura geométrica octahedral (33).

Además, la capacidad de formar tales complejos está relacionada con una disposición orto-dihidroxilo en el anillo B, de modo que mientras los glucósidos de cianidina, delfinidina y petunidina pueden formarse, los de malvidina, pelargonidina y peonidina no pueden formarse (3). Si bien los iones metálicos pueden influir en la estabilidad del color de un colorante, por ejemplo, la cianidina puede quelarse con aluminio dando un efecto protector al colorante, pero peonidina no (55). Por tanto, no todas las antocianinas pueden quelarse con un ion metálico específico. Además, el pH es un factor que influye para que ocurra la reacción de quelación de las antocianinas (55). Además, la presencia en mayor cantidad de ion metálico y la mayor concentración de un tipo de antocianina que puede quelarse con ese ion y puede estar relacionado con la estabilidad del color en una especie vegetal (24). Por otra parte, los iones metálicos como el estaño pueden influir en la estabilidad del color de las antocianinas, pero si la concentración del compuesto antociánico es muy bajo, aunque tengan la capacidad de formar quelatos no influirá en la estabilidad de color (86).

La estabilidad de los colores en una especie vegetal, se debe a que estructuralmente están formado por complejos denominados protocianina, es el caso del color azul de la *Centaurea cyanus* o acianos azules flor comestible originaria de Europa y Asia occidental que se desarrolla junto a los campos de cereales, su color se debe a un complejo tetrametálico formado por un ion férrico, un ion de magnesio y dos iones de calcio, los iones internos  $Fe^{+3}$  y  $Mg^{+2}$  están coordinados con seis moléculas de antocianinas (tres con hierro y tres con magnesio) y los dos iones externos de calcio están coordinados con tres moléculas de flavona cada una que provocan la copigmentación y estabilizan la molécula, más aún cuando, las antocianinas del tipo cianidina y delfinidina forman colores azules (53), asimismo, se encontró que el color azul de la amapola es debido al complejo formado por los iones  $Fe^{+3}$  y  $Mg^{+2}$  con las antocianinas y los flavonoles que pueden acumularse a ambos lados del núcleo de antocianidina

que estabilizan el color por efecto de copigmentación (51), en el caso de las antocianinas los copigmentos más fuertes son los derivados del ácido ferúlico y rosmarínico, pero también el ácido cafeico (87).

En cuanto a la formación de complejos de compuestos antocianicos con iones metálicos, es difícil de predecir con exactitud la estructura molecular del complejo, pero si, se sabe que los iones metálicos van a formar enlaces hexacoordinados con las antocianinas, y se ubican en la esfera interna, mientras que, en la esfera externa puede estar un metal unido a moléculas de flavona, en el caso del ciano azul que ya señalamos, en la esfera interna esta dos iones  $\text{Fe}^{+3}$  y el  $\text{Mg}^{+2}$  unidos a antocianinas y en la esfera externa están dos iones de calcio unido a moléculas de flavona. Mientras que, en nuestro estudio se está prediciendo que en la esfera interna está el ion  $\text{Mg}^{+2}$  unido a antocianinas y en la esfera externa está el ion cloro, cuya estructura octahedral se denominó  $[\eta^6(\text{antocianina})_6\text{Magnesio (II)}].6\text{Cl}^-$ , que se fundamenta de acuerdo a la estequiometría y al comportamiento del ion magnesio para formar complejos de coordinación. Además, esta fórmula se dedujo en función de las relaciones estequiométricas y el comportamiento del ion magnesio como dador de orbitales  $\text{sp}^3\text{d}^2$  (71), ya que al ionizarse el magnesio por reacción con el HCl deja un orbital  $3\text{s}^2$  vacío y abre los orbitales  $3\text{p}_x$ ,  $3\text{p}_y$ ,  $3\text{p}_z$ ,  $3\text{d}_{xy}$  y  $3\text{d}_{yz}$  para aceptar 6 ligantes dados por el oxígeno de las antocianinas, por eso se le denomina también hexadentado de estructura geométrica octahedral (71).

Existe una variedad de *D. trifida* L incolora respecto a *D. trifida* L (sachapapa morada) que presenta un color purpura con algunas variaciones, se señala que se debe a la presencia de peonidina-3,5-diglucósido, malvidina-3,5-diglucósido y malvidina-3,5-diglucósido-ácido ferúlico (6). Además, el desarrollo del mecanismo para formar el color azul es complejo, si se usa el ion magnesio para formar el complejo resultará de color azul, pero si usa el ion férrico aparecerá el color violeta y la unión de estas dos formarán un complejo de color azul violeta (88). Estos estudios revelan que un color específico de los órganos vegetales se debe a la presencia de antocianinas, ya conocidas con algunos compuestos adicionales en la estructura glicosídica, pero a la vez estos forman complejos con ciertos iones metálicos para dar una coloración más encendida y estable. Se ha encontrado que el ion magnesio forma un complejo de color azul vistoso, es la

razón por la cual se usó este metal como estabilizante asociado con el color de *D. trifida* L obteniéndose una coloración estable.

En contraste a nuestro estudio, se ha tratado de estabilizar con el uso de gelatina y carboxi-metil-celulosa para mantener estable el colorante extraído de *D. trifida* L y eliminando el exceso de humedad a 165°C (2), este procedimiento no es el más adecuado si se pretende estabilizar el colorante debido a que las antocianinas son termolábiles y pierden su estabilidad, aunque se añada compuestos estabilizadores. Siguiendo la búsqueda de estabilizadores, se usó maltodextrina-goma arábica secado por aspersion y por gelificación térmica, pectina citrus y goma adraganta para estabilizar el colorante extraído de *Morus nigra* L. y *Rubus fruticosus* L. (29). En otra investigación se usó maltodextrina y goma arábica para estabilizar las antocianinas extraídas de *Zea mays* L. (25). También, se usó perlas de alginato de calcio para estabilizar los colores por encapsulación para incorporar a derivados lácteos (89). El colorante obtenido de *Myrciaria* ssp fue estabilizado con maltodextrina y goma arábica, secado por aspersion en diferentes formulaciones, los colorantes microencapsulados con maltodextrina y goma arábica presentaron mayor retención del color en un periodo más prolongado (30). Asimismo, el colorante antociánico de berenjena fue estabilizado con maltodextrina y secado por aspersion y la estabilidad evaluada después de añadir a bebidas isotónicas y a base de aloe vera, estas presentaron mayor retención del color entre 54 y 77,5% a temperatura de 4°C que las bebidas que no fueron sometidas a evaluación (26). Además, fue evaluada la prueba de estabilidad del colorante obtenido de *Renealmia Alpinia* por método diferencial de pH (90).

Para determinar la vida útil del complejo que se obtuvo se hizo las mediciones de la absorbancia mediante espectrometría UV-visible a una longitud de onda máxima de absorción de 520nm, en un periodo de diez meses, con esos datos se estimó la vida útil del complejo usando mínimos cuadrados, las estimaciones de las absorbancias en el tiempo se detalla en el anexo 7, se observa que en 3 años hay una variación de la absorbancia de 0,109, en la primera cifra del valor decimal que se considera que es el límite de la vida útil del complejo formando. Comparando con los resultados de otros estudios donde las antocianinas



estabilizadas con maltodextrina y goma arábica que fue de 9 días a temperatura de 20°C y a temperatura de 4°C está no pasa de 33 días, después en ese periodo se degradó el 80% perdiendo los parámetros de calidad del producto (25). También, los colorantes antociánicos obtenido de cascara de *Myrciaria* sp estabilizados con maltodextrina y goma arábica se degradaron en 21 días, tiempos cortos a pesar que se mantuvo el estabilizado a temperatura de 25°C y 10°C respectivamente (30), el colorante antociánico de berenjena estabilizado con maltodextrina y almacenado a 25°C se degradó el 46% a 40 días, y a temperatura de 4°C el 22,5%, las variaciones del color sufrido es poco significativo a pesar de cambios ostensibles de temperatura (26). Además, el contenido de antocianinas de los polvos de zanahoria encapsulados usando maltodextrina como estabilizante y almacenadas a 25°C durante 64 días disminuyó en un 33 % y a 4 °C 11% (91). Se puede observar que, los colorantes antociánicos estabilizados con maltodextrina, goma arábica y otros, tienen una vida útil muy corta tal como muestran los estudios, mientras que, el colorante estabilizado con iones metálicos divalentes como el magnesio para preservar el color forma compuestos de coordinación o quelatos que tienen mayor vida útil, comparativamente superior a los que se obtiene cuando se estabiliza usando compuestos de inclusión

Finalmente, la estabilización de compuestos antociánicos por formación de complejos coordinados con iones metálicos es diferente al método de estabilización usando otros compuestos como maltodextrina, goma arábica, que propiamente hacen un modelo de inclusión huésped-hospedero mientras que por formación de complejos se obtiene como resultado una molécula compleja estructuralmente, que prolonga ostensiblemente la vida útil del colorante derivatizado.

## CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

La cantidad de colorante matriz extraído de *D. trifida* L. variedad morada es de 6%, este resultado puede variar de acuerdo al estado de madurez del tubérculo, diferencias morfológicas y lugar donde crece la especie, así como de las condiciones de extracción.

En el colorante matriz se ha identificado cuatro antocianidinas por cromatografía de papel en base a sus valores  $R_{f \times 100}$ , cianidina, peonidina, malvidina y pelargonidina y sus respectivas antocianinas tales como cianidina-3-rhamnosil-glucósido, peonidina-3,5-diglucósido, malvidina-3,5-diglucósido y pelargonidina-3,5-diglucósido, siendo la cianidina-3-rhamnosil-glucósido la que se encuentra en mayor porcentaje.

La formación del complejo hexacoordinado con el ion magnesio y ion cloro es cianidina-3-rhamnosil-glucósido, porque se encuentra en mayor concentración respecto a las demás antocianinas, además, peonidina, malvidina y pelargonidina no pueden formar complejos por la estructura molecular que poseen; porque la capacidad de formar complejos está relacionada con una disposición orto-dihidroxiado en el anillo B.

El complejo formado por reacción de la antocianina con los iones magnesio y cloro dieron un color intenso que corresponde probablemente a la estructura  $[\eta^6(\text{antocianina})_6\text{Magnesio (II)}] \cdot 6\text{Cl}^-$ . Complejo soluble en alcohol y agua que tiene una proyección de vida útil en función de la absorbancia y del tiempo de 3 años.

## CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

- Hacer un estudio del producto obtenido por resonancia paramagnética electrónica, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear a fin de demostrar la exactitud de los constituyentes y su configuración isomérica más exacta ya que estas técnicas no poseemos en la universidad nacional de la amazonia peruana.
- Promocionar el cultivo de *D. trifida* L (sachapapa morada) a mayor escala para su utilización como colorante natural no solo por la tinción de alimentos orientados su uso en la alimentación humana, sino también para su uso en la industria cosmética y en las bebidas, sin desestimar el contenido de diosgenina que posee, un fitoesteroide antiinflamatorio potente.

## CAPÍTULO VIII. FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Duke AJ, Vásquez R. Amazonian ethnobotanical dictionary. Raton B, editor. USA; 1994.
2. Colomé F de M, Garcia-Pinche R, Carranza J, Alva A. Obtaining coloring from *Dioscorea trifida* (sachapapa morada) by atomization. Conoc Amaz. 2010;1(1):77-83.
3. Harborne JB. Phytochemical methods. Chapman AH, editor. London; 1973.
4. Ramos-Escudero F, Muñoz AM, Alvarado-Ortiz Ureta C, Yáñez JA. Antocianinas , polifenoles, actividad anti-oxidante de sachapapa morada (*Dioscorea trifida* L.) Y evaluación de lipoperoxidación en suero humano. Rev Soc Química Perú. 2010;76(1):61-72.
5. Ramos-Escudero F, Santos-Buelga C, Pérez-Alonso JJ, Yáñez JA, Dueñas M. HPLC-DAD-ESI/MS identification of anthocyanins in *Dioscorea trifida* L. yam tubers (purple sachapapa). Eur Food Res Technol. 2010;230:745-52.
6. Carreño-Díaz R, Grau N. Anthocyanin pigments in *Dioscorea tryphida* L. J Food Sci. 1977;42(3):615-7.
7. Alberca Laveriano LD, Carrero Tejada SA, Flores Barraza RR, Ancieta Dextre CA (asesor). Condiciones favorables para la extracción de antocianinas a partir de la sachapapa morada (*Dioscorea trifida* L) mediante un equipo Soxhlet. Universidad Nacional del Callao; 2017.
8. Acuña Osorio JJ. Sustitución parcial de la harina de trigo (*Triticum spp*) por harina cucedánea de sachapapa morada (*Dioscorea trifida*) en la elaboración de pan. Universidad Nacional Intercultural de la Amazonia; 2019.
9. Asencios Tarazona V, Flores Flores J. Harina de sachapapa morada (*Dioscorea trifida* L.) como sustituto en la elaboración de pan comercial. Cienc Lat Rev Científica Multidiscip. 2021;5(2):2049-66.
10. Coria Muñoz L, Maihua RE, Peralta FL, Tereschuk ML, González M, Albarracín PM. Análisis de antocianinas en arándanos del NOA (*Vaccinium corymbosum* L.) [Internet]. Vol. 55, Facultad de ciencias exactas y tecnología, Universidad Nacional Tucum. Tucuman, Argentina; 1997. Available from: <http://www.fcdei.uncu.edu.ar/upload/04atc-coria-munoz-utn.pdf>

11. Vargas Simón G, Soto Hernández RM, Rodríguez González MT. Análisis preliminar de antocianinas en fruto de icaco. *Rev Fitotec Mex.* 2002;25(3):261-4.
12. Gibaja Oviedo S. Guía para el análisis de los compuestos de carbono. Lima-Peru: Editorial UNMSM; 1977.
13. Abdel-Aal ESM, Abou-Arab AA, Gamel TH, Hucl P, Young JC, Rabalski I. Fractionation of blue wheat anthocyanin compounds and their contribution to antioxidant properties. *J Agric Food Chem.* 2008;56(23):11171-7.
14. Wang SY, HsinShan L. Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry,. *J Agric Food Chem.* 2000;48(2):140-6.
15. Figueroa R, Tamayo J, González S, Moreno G, Vargas L. Actividad antioxidante de antocianinas presentes en cáscara de pitahaya (*Hylocereus undatus*). *Iberoam Technol Postcosecha.* 2011;12:44-50.
16. Abdel-Aal ESM, Young JC, Rabalski I. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *J Agric Food Chem.* 2006;54(13):4696-704.
17. Saavedra Alarcón LS, Símpalo López WB. Estudio del proceso de extracción de antocianinas a partir de frambuesa (*Rubus idaeus* L). *Lambayeque-2018. revistas.uss.edu.pe.* 2019;6(1):86-95.
18. Hassimotto NMA, Genovese MI, Lajolo FM. Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra* L.) growing in Brazil. *Food Sci Technol Int.* 2007;13(1):17-25.
19. Delgado Cabrera NT, Bedoya Justo E virgilio. Extracción de antocianinas a partir de la coronta y grano de maíz morado ( *Zea mays* L .) de la Provincia de Tarata-Tacna, Perú. *Rev ciencia y Technol para el Desarro.* 2019;5(10):4-9.
20. Del Valle Leguizamón G, González León A, Báez Sañudo R. Antocianinas en uva (*Vitis vinifera* L .) y su relación con el color. *Rev Fitotec Mex.* 2005;28(4):359-68.
21. Cuesta Riaño CS, Castro Guasca MP. Efecto de pretratamientos en la extracción de antocianinas de la mora catilla (*R. glaucus*) y silvestre (*R. adenotrichos*), para su uso como indicara visual de pH. *Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano;* 2018.
22. Hung CY, Murray JR, Ohmann SM, Tong CBS. Anthocyanin accumulation

- during potato tuber development. *J Am Soc Hortic Sci.* 1997;122(1):20-3.
23. Jackman RL, Yada RY, Tung MA, Speers RA. Anthocyanins as food colorants - A review. *J Food Biochem.* 1987;11:201-47.
  24. Castañeda-Ovando A, Galán-Vidal CA, Pacheco-Hernández M de L, Rodríguez JA, Páez-Hernández ME. Evaluación del contenido de metales y su efecto en la estabilidad de antocianinas. *CYTA - J Food.* 2009;7(3):225-32.
  25. Mendoza Sillerico E V., Curi Borda CK, Rojas Mercado VJ, Alvarado Kirigin JA. Encapsulation, characterization and thermal stability of anthocyanins from *Zea mays* L. (purple Corn). *Rev Boliv Química.* 2016;33(5):183-9.
  26. Arrazola G, Herazo I, Alvis A. Obtención y evaluación de la estabilidad de antocianinas de berenjena (*Solanum melongena* L.) en bebidas. *Inf Tecnol.* 2014;25(3):43-52.
  27. Orozco JC, Gattorno GR, Pedroza R. Nanofibras de gliadina para la estabilización de antioxidantes extraídos de maíz azul. In: IV Simposio de Tecnología Avanzada. Mexico, Distrito Federa: CICATA-IPN; 2009.
  28. Acciarri G, Guercetti J, Risso P, Hidalgo M. Estabilización de antioxidantes naturales por encapsulación [Internet]. Rosario, Argentina; 2017. Available from: <http://hdl.handle.net/2133/11430>
  29. Niño Vega EM. Desarrollo y estabilización de colorantes alimentarios a partir de extractos de moras. Universidad de Salamanca e Instituto Politécnico de Brangança. Universidad de Salamanca; 2019.
  30. Silva GJF, Constant PBL, Figueiredo RW, Moura SM. Formulação e estabilidad de corantes de antocianinas extraídas das cascas de jabuticaba (*Myrciaria* ssp). *Alimentos y Nutr.* 2010;21(3):429-36.
  31. Garzón GA. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Acta Biol Colomb.* 2008;13(3):27-36.
  32. Moeller T. Química inorgánica. Reverte S.A. Madrid, España: Reverte S.A.; 2023.
  33. Vallet M, Faus J, Garcia-España E, Moratal J. Introducción a la química bioinorgánica. Madrid, España: Editorial Síntesis S.A; 2003. 591 p.
  34. Martínez Reyes N. Análisis de características diferenciales entre antocianinas y betacianinas en extractos de plantas mediante pruebas de color. *Ambiociencias.* 2018;16:38-48.

35. Gorriti G. A, Quispe J. F, Arroyo A. JL, Córdova R. A, Jurado T. B, Santiago A. I, et al. Extracción de antocianinas de las corontas de *Zea mays* L. (maíz morado). *Cienc Invest* [Internet]. 2009;12(2):64-74. Available from: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/viewFile/3395/4496>
36. Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach* Hardcover. Segunda. 2002.
37. Montaldo Á. *Cultivo de raíces y tubérculos tropicales*. Segunda Ed. San Jose, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura IICA; 1991. 426 p.
38. Beyerlein P, Pereira H dos S. Morphological diversity and identification key for landraces of the Amerindian yam in central Amazon. *Pesqui Agropecu Bras*. 2018;53(4):405-18.
39. Evans WC, Trease GE. *Farmacognosia*. 13 Edicion. Madrid, España: Interamericana; 1991.
40. Jaguey-Hernández Y, Castañeda Ovando A. ¿Sabías que el color de muchas especies vegetales se debe a las antocianinas y sus interacciones? *Con-Ciencia Boletín Científico la Esc Prep No 3*. 2023;10(19):1-4.
41. Alberto Marco J. *Química de los productos naturales*. S.A S, editor. Madrid - España; 2006. 288 p.
42. Ortega GM, Guerra M. Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químico-físicos, parte II. *ICIDCA*. 2006;(3).
43. Dey PM, Harborne JB. *Plant biochemistry*. Dey PM, Harborne JB, editors. Elsevier; 1997.
44. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. *The systematic identification of flavonoids*. Primera ed. Springer-Verlag. New York: Springer-Verlag; 1970. 320 p.
45. Oliveira H, Correia P, Pereira AR, Araújo P, Mateus N, de Freitas V, et al. Exploring the applications of the photoprotective properties of anthocyanins in biological systems. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):1-33.
46. Mattioli R, Francioso A, Mosca L, Silva P. Anthocyanins : A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases. *Molecules*. 2020;25(17):3809.

47. Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, Scaccini C. Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated from an Italian Red Wine. *J Agric Food Chem.* 1998;46(2):361-7.
48. Aguilera Ortíz M, Reza Vargas M del C, Chew Madinaveitia RG, Meza Velázquez JA. Propiedades funcionales de las antocianinas. *Rev Biotecnología Rev Ciencias Biológicas y la Salud.* 2011;8(2):16-22.
49. Bate-Smith EC. Paper chromatography of anthocyanins and related substances in petal extracts. *Nature.* 1948;161:835-8.
50. Dominguez Sepúlveda XA. Métodos de investigación fitoquímica. Primera Ed. Mexico: Limusa; 1979. 281 p.
51. Yoshida K, Kitahara S, Ito D, Kondo T. Ferric ions involved in the flower color development of the Himalayan blue poppy, *Meconopsis grandis*. *Phytochemistry.* 2006;67(10):992-8.
52. Kondo T, Ueda M, Tamura H, Yoshida K, Isobe M, Goto T. Composition of Protocyanin, A Self-Assembled Supramolecular Pigment from the Blue Cornflower, *Centaurea cyanus*. *Angew Chemie Int Ed English.* 1994;33(9):978-9.
53. Shiono M, Matsugaki N, Takeda K. Structure of the blue cornflower pigment. *Nature.* 2005;436(11 August 2005):1.
54. Hale KL, McGrath SP, Lombi E, Stack SM, Terry N, Pickering IJ, et al. Molybdenum sequestration in Brassica species. A role for anthocyanins? *Plant Physiol.* 2001;126(4):1391-402.
55. Starr MS, Francis FJ. Effect of metallic ions on color and pigment content of cranberry juice cocktail. *J Food Sci.* 1973;38(6):1043-6.
56. Sigurdson GT, Robbins RJ, Collins TM, Giusti MM. Evaluating the role of metal ions in the bathochromic and hyperchromic responses of cyanidin derivatives in acidic and alkaline pH. *Food Chem [Internet].* 2016;208:26-34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.109>
57. Rimas Cruz AB, Iglesias Solis Y. Obtención de maltodextrina mediante hidrólisis enzimática a partir del almidón de centeno (secale cereale) en tres diferentes parámetros de temperatura y concentración de almidón. Universidad Hermilio Valdizá - Huánuco; 2021.
58. Kennedy JF, Knill CJ, Taylor DW. Maltodextrins. In: Kearsley MW, Dziedzic SZ, editors. *Handbook of Starch Hydrolysis Products and their Derivatives* ||



- Maltodextrins. Boston, MA: Springer; 1995. p. 65-82.
59. Parikh A, Agarwal S, Raut K. A review on applications of maltodextrin in pharmaceutical industry. *Int J Pharm Biol Sci.* 2014;4(4):67-74.
  60. Pérez González E, Santos Rodríguez F, Coto García E. Homeostasis del magnesio. Etiopatogenia, clínica y tratamiento de la hipomagnesemia. A propósito de un caso. *Nefrología.* 2009;29(6):518-24.
  61. Curbelo Hernández C, Moreno Quintero ME, Ramirez Hernández D, Crespo Zafra LM. Hidrólisis ácida del bagazo de Aloe vera (sábila) para la obtención de pectina. *Cent Azucar.* 2017;44(2):18-26.
  62. Cerón-Salazar I, Cardona-Alzate C. Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de la cáscara de naranja. *Ing y Cienc - ing.cienc* [Internet]. 2011;7(13):65-86. Available from: <http://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/ingciencia/article/view/401>
  63. Eliseo Stechina D. Estudios de obtención de pectina aplicando procesos de membrana. Universidad Nacional del Litoral; 2005.
  64. López Sampedro SE, Almeida Hidalgo M. Obtención de colágeno de escamas hidrolizado con Rennina. *Rev Caribeña Ciencias Soc* [Internet]. 2018;(2018-06):1-8. Available from: [//www.eumed.net/rev/caribe/2018/06/obtencion-colageno.html](http://www.eumed.net/rev/caribe/2018/06/obtencion-colageno.html)
  65. Tenelema Buñay MP. Otención de colágeno de las patas de pollo con la aplicación de niveles de 2, 4, 6% de pepsina. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2017.
  66. Corona Martínez R, Quincoces Suárez M, Fuentes AC, Ulloa H, Rivera Borroto OM, Hereira A, et al. Evaluación integral de un procedimiento tecnológico para la obtención del Agar Agar desde el alga *Gracilaria blodgettii* de la bahía de Cienfuegos. *Rev Cuba Química.* 2007;XIX(1):36-9.
  67. Establier R. Variación estacional de la composición, extracción y características del agar agar de algunas algas (género *Gelidium*) de la costa sudatlántica española. 1964. p. 165-94.
  68. Maroto B, Madoery R, Camusso C. Purificación de lecitina de soja. 1- Selección de equipamiento y determinación de las condiciones operativas. 2-Obtención de diagrama de equilibrio. *Grasas y Aceites.* 1992;43(6):6-10.
  69. Cabezas DM, Madoery R, Tomás MC. Lecitinas hidrolizadas de girasol . Obtención y aplicación en emulsiones aceite en agua (O/W). In: In III

- Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos-CICyTAC (Córdoba, 15 al 17 de abril de 2009). Cordova; 2009.
70. Shechter M. Magnesium and cardiovascular system. *Magnes Res.* 2010;23(2):60-72.
  71. Moeller T. Herald. *Química Inorgánica*. Editorial Reverté SA; 1961.
  72. Jannen-Dechent W, Ketteler M. Magnesium basics. *CKJ Clin Kidney J.* 2012;5(SUPPL. 1):i3-14.
  73. Balboa Benavente S. *Química de coordinación de iones metálicos en estado de oxidación II derivados de  $\alpha$ -hidroxicarboxilatos*. [Santiago de Compostela]: Universidad Santiago de Compostela; 2007.
  74. Hernandez Sampieri R, Fernandez Collado C, Baptista Lucio M del P. *Metodología de la investigación*. Quinta Edi. Interamericana Editores SADC., editor. México: McGraw Hill; 2010. 656 p.
  75. Spiegel Murray R. *Estadística*. McGraw Hill (Fondo); 1979. 44 p.
  76. Ochoa S, Osorio-Tobón JF. Isolation and characterization of starch from the Purple Yam (*Dioscorea alata*) anthocyanin extraction residue obtained by ultrasound-assisted extraction. *Waste and Biomass Valorization* [Internet]. 2024;15(1):379-89. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12649-023-02155-y>
  77. Santos S de JL, Canto HKF, da Silva LHM, Rodrigues AM da C. Characterization and properties of purple yam (*Dioscorea trifida*) powder obtained by refractance window drying. *Dry Technol* [Internet]. 2022;40(6):1103-13. Available from: <https://doi.org/10.1080/07373937.2020.1847140>
  78. Teixeira AP, Oliveira IM., Lima E., Matsuura T. The use of purple yam (*Dioscorea trifida*) as a health-promoting ingredient in bread making. *J Res Biol* [Internet]. 2013;3(1):747-58. Available from: <http://jresearchbiology.com/documents/RA0306.pdf>
  79. Silva GM de S, Veloso CM, Santos LS, Melo Neto BA de, Fontan R da CI, Bonomo RCF. Extraction and characterization of native starch obtained from the inhambu tuber. *J Food Sci Technol.* 2020;57(5):1830-9.
  80. Esamat Yuu MR. Efecto del tipo de cocción en el contenido antociánico y capacidad antioxidante se sacha papa morada (*Dioscorea trifida* L.). Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; 2020.

81. Ramos-Escudero F, Muñoz AM, Alvarado-Ortiz Ureta C, Yáñez JA. Antocianinas , polifenoles, actividad anti-oxidante de sachapapa morada (*Dioscorea trifida* L.) Y evaluación de lipoperoxidación en suero humano. Rev Soc Química Perú. 2010;76(1):61-72.
82. Moriya C, Hosoya T, Agawa S, Sugiyama Y, Kozone I, Shin-Ya K, et al. New acylated anthocyanins from purple yam and their antioxidant activity. Biosci Biotechnol Biochem. 2015;79(9):1484-92.
83. Pérez Arévalo J, Ramírez Saavedra R, Adrianzen Julca P, Cobos Ruiz M, Castro Gómez J. Diversidad genética de *Dioscorea trifida* “sachapapa” de cinco cuencas hidrográficas de la amazonía peruana. Cienc Amaz. 2013;3(2):74.
84. Tuisima-Coral LL, Guillén Huachua WF. Genetic variability of yam (*Dioscorea trifida*) genotypes in the Ucayali region, Peru. Agron Colomb. 2022;40(1):12-21.
85. Srivichai S, Hongsprabhas P. Profiling Anthocyanins in Thai Purple Yams (*Dioscorea alata* L.). Int J Food Sci. 2020;2020.
86. Wrolstad RE, Erlandson JA. Effect of metal ions on the color of strawberry puree. Food Sci Technol. 1973;38:460-3.
87. Eiro MJ, Heinonen M. Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. J Agric Food Chem. 2002;50(25):7461-6.
88. Kondo T, Ueda M, Isobe M, Goto T. A new molecular mechanism of blue color development with protocyanin, a supramolecular pigment from cornflower, *Centaurea cyanus*. Tetrahedron Lett. 1998;39(45):8307-10.
89. Acciarri G. Estabilización de antioxidantes naturales por encapsulación y su incorporación a derivados lácteos con valor agregado. In: XXI Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, mArgentina; 2017. p. 4.
90. Noriega Rivera P, Coba Santamaría P, Naikiai J, Abad J. Extracción, pruebas de estabilidad y análisis químico preliminar de la fracción colorante obtenido a partir del exocarpo del fruto de *Renealmia Alpinia*. La Granja. 2011;13(1):13.
91. Ersus S, Yurdagel U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. J Food Eng. 2007;80(3):805-12.

## ANEXOS

### Anexo 1. Identificación botánica de la planta



UNAP

Centro de Investigación de  
Recursos Naturales  
Herbarium Amazonense — AMAZ

INSTITUCIÓN CIENTÍFICA NACIONAL DEPOSITARIA DE MATERIAL BIOLÓGICO  
CÓDIGO DE AUTORIZACIÓN AUT-ICND-2017-005

### CONSTANCIA DE DETERMINACIÓN BOTÁNICA n.º 068-2023 AMAZ-UNAP

El Coordinador del Herbarium Amazonense (AMAZ) del Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA), de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana.

#### HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentada por **SEVERINO GALLARDO DAHUA** y **DARIO TAMAYA ANDRADE**, bachilleres de la **Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica** de la **Facultad de Farmacia y Bioquímica** de la **Universidad Nacional de la Amazonia Peruana** pertenece al proyecto de tesis de pre grado titulado **“IDENTIFICACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS POR ACOPLAMIENTO CON MAGNESIO DE *Dioscorea trifida* L. PARA SU USO EN ALIMENTOS”**; ha sido **DETERMINADA** en este centro de investigación y enseñanza **Herbarium Amazonense-AMAZ-CIRNA-UNAP**, como se indica a continuación:

Nº	FAMILIA	ESPECIE	AUTOR	NOMBRE COMÚN
01	DIOSCOREACEAE	<i>Dioscorea trifida</i>	L. f.	“sacha papa”

Determinador: Ing. Juan Celidonio Ruiz Macedo

A los once días del mes de diciembre del año dos mil veintitrés, se expide la presente constancia a los interesados para los fines que se estime conveniente.

Atentamente,

  
**Richard J. Huaranca Acostupa**  
Coordinador Herbarium Amazonense  
CIRNA - UNAP



## Anexo 2. Fotografía del proceso



Recolección de muestra (sachapapa morada)



Muestra cortada en trozos para el rallado



Extracción del colorante



Filtración



Desengrasado



Concentrado



Cromatografía



Cromatografía de papel en HCl al 1% y BAW



Fracciones para determinar R<sub>f</sub>100



Cromatografía para identificar antocianinas y antocianidinas



Hidrólisis de antocianina



Colorante estabilizado con Mg<sup>2+</sup>

### Anexo 3. Determinación del rendimiento del colorante de *D. trifida* L

#### Determinación de la humedad

Muestra húmeda : 5,0g

Muestra seca : 1,5g

Con este resultado se calculó para los 500g de muestra trabajada

$$\left. \begin{array}{l} 5g \dots\dots 1,5g \\ 500g \dots\dots x \end{array} \right\} \rightarrow x = 150g$$

Muestra seca : 150g

#### Extracto del colorante

Se obtuvo 600mL de extracto del colorante

#### Secado del colorante

Muestra líquida : 20mL

Muestra seca : 0,30g

Con este resultado se calculó para los 600 mL

$$\left. \begin{array}{l} 20 \text{ mL} \dots\dots 0,3g \\ 600 \text{ mL} \dots\dots x \end{array} \right\} \rightarrow x = 9,0g$$

Muestra seca colorante : 9,0g

Con estos se calculó el rendimiento

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{peso del colorante obtenido}}{\text{peso de muestra seca}} \cdot 100$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{9}{150} \cdot 100 = 6\%$$

## Anexo 4. Determinación de los vales de Rf de las antocianinas

### Cromatografía de papel

#### A. En ácido clorhídrico (HCl) al 1%

##### Primera franja

Los valores de las distancias recorridas por el soluto y solvente fueron las siguientes:

Distancia recorrida por el soluto	7,22cm
Distancia recorrida por el solvente	38,00cm

$$Rf = \frac{\text{Distancia corrida por el soluto}}{\text{Distancia corrida por el solvente}} \cdot 100 \rightarrow Rf = \frac{7,22}{38,00} \cdot 100 = 19$$

Este valor de Rf corresponde a cianidina-3-rhamnosil-glucósido (cianina) (Harborne 1973).

##### Segunda franja

Distancia recorrida por el soluto	8,36cm
Distancia recorrida por el solvente	38,00cm

$$Rf = 22$$

Este valor de Rf corresponde a malvidina-3,5-diglucósido (malvina) (Bate Smith 1948).

##### Tercera franja

Distancia recorrida por el soluto	6,46cm
Distancia recorrida por el solvente	38,00cm

$$Rf = 17$$

Este valor de Rf corresponde a peonidina-3,5-diglucósido (peonina) (Ramos-Escudero 2010).

##### Cuarta franja

Distancia recorrida por el soluto	8,74cm
Distancia recorrida por el solvente	38,00cm

$$Rf = 23$$

Este valor de Rf corresponde a pelargonidina-3,5-diglucósido (pelargonina) (Harborne 1973).

## B. En sistema BAW

### Primera franja

Los valores de las distancias recorridas por el soluto y solvente fueron las siguientes:

Distancia recorrida por el soluto 14,10cm

Distancia recorrida por el solvente 38,00cm

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el soluto}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}} \cdot 100 \rightarrow Rf = \frac{14,1}{38,00} \cdot 100 = 37$$

Este valor de Rf corresponde a cianidina-3-rhamnosil-glucósido (cianina) (Harborne 1973).

### Segunda franja

Distancia recorrida por el soluto 11,78cm

Distancia recorrida por el solvente 38,00cm

$$Rf = 31$$

Este valor de Rf corresponde a malvidina-3,5-diglucósido (malvina) (Carreño-Díaz 1977).

### Tercera franja

Distancia recorrida por el soluto 8,74cm

Distancia recorrida por el solvente 38,00cm

$$Rf = 23$$

Este valor de Rf corresponde a peonidina-3,5-diglucósido (peonina) (Carreño-Díaz 1977).

### Cuarta franja

Distancia recorrida por el soluto 12,16cm

Distancia recorrida por el solvente 38,00cm

$$Rf = 32$$

Este valor de Rf corresponde a pelargonidina-3,5-diglucósido (pelargonina) (Harborne 1973).



## Anexo 5. Determinación de los vales de Rf de las antocianidinas

### Cromatografía de papel

#### A. En sistema forestal: HCl concentrado-ácido acético-agua (3:3:10)

##### Primera franja

Los valores de las distancias recorridas por el soluto y solvente fueron las siguientes:

Distancia recorrida por el soluto 18,62cm

Distancia recorrida por el solvente 38,00cm

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el soluto}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}} \cdot 100 \rightarrow Rf = \frac{18,62}{38,00} \cdot 100 = 49$$

Este valor de Rf corresponde a cianidina.

##### Segunda franja

Distancia recorrida por el soluto 22,80cm

Distancia recorrida por el solvente 38,00cm

$$Rf = 60$$

Este valor de Rf corresponde a malvidina.

##### Tercera franja

Distancia recorrida por el soluto 11,21cm

Distancia recorrida por el solvente 38,00cm

$$Rf = 29,5$$

Este valor de Rf corresponde a peonidina.

##### Cuarta franja

Distancia recorrida por el soluto 25,84cm

Distancia recorrida por el solvente 38,00cm

$$Rf = 68$$

Este valor de Rf corresponde a pelargonidina.

**B. En sistema fórmico:** [HClconc-ácido fórmico-agua (2:5:3)]

**Primera franja**

Los valores de las distancias recorridas por el soluto y solvente fueron las siguientes:

Distancia recorrida por el soluto 8,36cm

Distancia recorrida por el solvente 38,00cm

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el soluto}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}} \cdot 100 \rightarrow Rf = \frac{8,36}{38,00} \cdot 100 = 22$$

Este valor de Rf corresponde a cianidina

**Segunda franja**

Distancia recorrida por el soluto 10,30cm

Distancia recorrida por el solvente 38,00cm

$$Rf = 27$$

Este valor de Rf corresponde a malvidina.

**Tercera franja**

Distancia recorrida por el soluto 11,25cm

Distancia recorrida por el solvente 38,00cm

$$Rf = 30$$

Este valor de Rf corresponde a peonidina.

**Cuarta franja**

Distancia recorrida por el soluto 12,54cm

Distancia recorrida por el solvente 38,00cm

$$Rf = 33$$

Este valor de Rf corresponde a pelargonidina.

## Anexo 6. Determinación de los pesos de muestra y reactivos

### Determinación peso muestra

Muestra líquida : 20mL

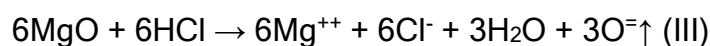
Muestra seca : 0,3g

Con este resultado se calculó para los 40,2mL de muestra

$$\left. \begin{array}{l} 20 \text{ mL} \dots\dots\dots 0,3\text{g} \\ 40,2 \text{ mL} \dots\dots\dots x \end{array} \right\} \rightarrow x = 0,603\text{g}$$

Muestra seca colorante : 9g

### Calculo de las masas de los reactantes y producto



$$6(40,304) + 6(36,46) \rightarrow 6(24,305) + 6(35,453) + 3(18,0153) + 3(15,999)$$

$$241,82\text{g} + 218,76\text{g} \rightarrow 145,83\text{g} + 212,72\text{g} + 54,04\text{g} + 47,99\text{g}$$

$$460,58\text{g} \rightarrow 460,58\text{g}$$

Para trabajar con masas mas pequeñas se dividió entre el peso de oxido de magnésio a todas las masas que intervienen en la reaccion.

$$\frac{241,82 \text{ g}}{241,82} + \frac{218,76 \text{ g}}{241,82} \rightarrow \frac{145,83 \text{ g}}{241,82} + \frac{212,72 \text{ g}}{241,82} + \frac{54,04 \text{ g}}{241,82} + \frac{47,99 \text{ g}}{241,82}$$

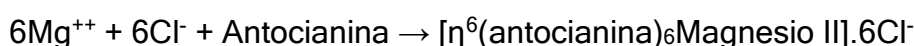
$$1\text{g} + 0,9046\text{g} \rightarrow 0,603\text{g} + 0,88\text{g} + 0,223\text{g} + 0,198\text{g}$$

$$1,9046\text{g} \rightarrow 1,9046\text{g}$$

Para hallar el volumen del ácido clorídrico se trabajo con su densidad (1,164g/mL)

$$\rho = \frac{m}{V} \rightarrow V = \frac{m}{\rho} \rightarrow V = \frac{0,9046}{1,164} = 0,777\text{mL}$$

### Calculamos el peso del complejo



$$0,603\text{g} + 0,88\text{g} + 0,603\text{g} \rightarrow 2,086\text{g} [\eta^6(\text{antocianina})_6\text{Magnesio II}].6\text{Cl}^-$$

## Anexo 7. Determinación de la vida útil del colorante acomplejado con Magnesio II

Datos originales

N° de mediciones	Tiempo (t) meses	Absorbancia (y)
1	0	2,000
2	4	1,990
3	6	1,980
4	8	1,978
5	10	1,976

Con estos datos, se podrá predecir la estabilidad del complejo a través del tiempo, usando mínimos cuadrados.

N°	t	y	t <sup>2</sup>	t . y
1	0	2,000	0	0,000
2	4	1,990	16	7,960
3	6	1,980	36	11,880
4	8	1,978	64	15,824
5	10	1,976	100	19,760
	$\Sigma t = 28$	$\Sigma y = 9,924$	$\Sigma t^2 = 216$	$\Sigma t.y = 55,424$

Con estos valores se realizó el cálculo de “a” (intercepto) es decir el valor que corta el eje de las ordenadas, se aplica la expresión:

$$a = \frac{(\Sigma y)(\Sigma t^2) - (\Sigma t)(\Sigma ty)}{N \Sigma t^2 - (\Sigma t)^2}$$

$$a = \frac{(9,924)(216) - 28(55,424)}{5(216) - (28)^2}$$

$$a = 1,999 \text{ (intercepto)}$$

“a” es el intercepto, punto de inicio en la medición de la absorbancia en el eje de ordenada “y”.

Seguidamente se calculó el valor de la pendiente “m”, es decir, como va declinando la absorbancia en función del tiempo eje de abscisas t.

$$m = \frac{N \Sigma ty - (\Sigma t)(\Sigma y)}{N(\Sigma t^2) - (\Sigma t)^2}$$

$$m = \frac{5(55,424) - 28(9,924)}{5(216) - (28)^2}$$

$$m = -0,00279$$

con estos se calculó la vida útil del complejo antociánico en el tiempo, con la expresión:

$$y = a + m \cdot t$$

para tiempo: 0

$$y_0 = 1.999 + (-0.00279) (0)$$

$$y_0 = 1, 999$$

El mismo procedimiento se realizó para las demás absorbancias en el tiempo, los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tiempo (meses)	Absorbancia (y)
0	1,999
4	1,987
6	1,982
8	1,976
10	1,971
12	1,965
24	1,932
34	1,904
36	1,898

Entonces al observar que en 3 años hay una variación de la absorbancia de 0.109, en la primera cifra del valor decimal considerando que es el límite de la vida útil del complejo formando.