



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“OBTENCIÓN DE PIGMENTOS BIOACTIVOS A PARTIR
DE COL MORADA (*Brassica oleracea* var. *capitata*) Y
EVALUACIÓN DE SU APLICACIÓN EN UN PRODUCTO
ALIMENTICIO”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

FABIOLA FERNANDA PICHARDO PÉREZ

ASESORA

DRA. MA. DEL CARMEN HERNÁNDEZ JAIMES

COASESOR

DR. JUAN OROZCO VILLAFUERTE

2019



ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 1 MARCO TEÓRICO	6
1.1 COLORANTES	7
1.1.1 Clasificación de los colorantes	8
1.1.2 Colorantes naturales	9
1.1.2.1 Carotenoides	10
1.1.2.2 Clorofilas	10
1.1.2.3 Betalaínas	10
1.1.2.4 Hemopigmentos	11
1.1.2.5 Pigmentos fenólicos	11
1.1.2.5.1 Flavonoides	11
1.1.2.5.2 Taninos	11
1.1.2.5.3 Antocianinas	12
1.1.2.5.3.1 Estructura de las antocianinas	12
1.1.2.5.3.2 Estabilidad de las antocianinas	14
1.1.2.5.3.2.1 Efecto del pH en las antocianinas	14
1.1.2.5.3.2.2 Efecto de co-pigmentación en las antocianinas	15
1.1.2.5.3.2.3 Efecto de la temperatura en la estabilidad de las antocianinas ...	16
1.1.2.5.3.2.4 Efecto de la luz en la estabilidad de las antocianinas	17
1.1.2.5.3.2.5 Actividad antioxidante de las antocianinas	17
1.2 GENERALIDADES DE LA COL MORADA (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>)	18
1.2.1 Origen y distribución de <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i>	18
1.2.2 Taxonomía	18
1.2.3 Características botánicas	19
1.2.4 Antocianinas de <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	20
1.4 ANTIOXIDANTES	22
1.4.1 Clasificación de los antioxidantes	23
1.4.2 Actividad antioxidante	24
1.4.3 Cuantificación de la actividad antioxidante	25
1.4.3.1 Método DPPH'	25

1.4.3.2 Método ABTS ⁺	27
1.5 MEDICIÓN DE COLOR.....	28
1.6 APLICACIÓN DEL PIGMENTO BIOACTIVO EN UN PRODUCTO ALIMENTICIO	29
1.6.1 Gelatina	30
CAPÍTULO 2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	32
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	32
CAPÍTULO 3 HIPÓTESIS	33
CAPÍTULO 4 JUSTIFICACIÓN	35
CAPÍTULO 5 MATERIALES Y MÉTODO	37
5.1 MATERIALES	38
5.1.1 Material	38
5.1.2 Material vegetal.....	38
5.2 MÉTODOS	38
5.2.1 Procesamiento de la muestra	38
5.2.2 Método de extracción	38
5.2.3 Caracterización química de los extractos	39
5.2.3.1 Determinación de fenoles totales	39
5.2.3.2 Determinación de antocianinas	39
5.2.3.3 Determinación de la capacidad antioxidante por ABTS ⁺	39
5.2.3.4 Determinación de capacidad antioxidante por DPPH [•]	40
5.2.4 Evaluación de color.....	40
5.2.5 Medición de pH.....	40
5.2.6 Evaluación del efecto del pH en la tonalidad del extracto	41
5.2.6.1 Barrido espectrofotométrico	41
5.2.6.2 Evaluación de color	41
5.2.7 Obtención del pigmento bioactivo	41
5.2.7.1 Rendimiento del pigmento	41
5.2.7.2 Caracterización química del pigmento	42
5.2.7.2.1 Determinación de fenoles totales	42
5.2.7.2.2 Determinación de antocianinas	42
5.2.7.2.3 Determinación de capacidad antioxidante por ABTS ⁺	42
5.2.7.2.4 Determinación de capacidad antioxidante por DPPH [•]	42
5.2.8 Aplicación del pigmento bioactivo en un producto alimenticio	42

5.2.9 Determinación de estabilidad del color en gelatina	43
5.2.10 Prueba hedónica de gelatina adicionada con el pigmento bioactivo	43
5.2.11 Análisis estadístico	44
CAPÍTULO 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
6.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS	46
6.1.1 Determinación de fenoles totales	46
6.1.2 Determinación de antocianinas	47
6.1.3 Capacidad antioxidante	49
6.2 EVALUACIÓN DE COLOR DE LOS EXTRACTOS POR COLORIMETRÍA	50
6.3 MEDICIÓN DE pH DEL EXTRACTO	52
6.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL pH EN LA TONALIDAD DEL EXTRACTO	53
6.4.1 Espectro de absorción en antocianinas de <i>B. oleracea</i>	54
6.4.2 Evaluación de color	56
6.5 PIGMENTO BIOACTIVO	59
6.5.1 Rendimiento del pigmento	59
6.5.2 Caracterización química del pigmento	59
6.5.2.1 Determinación de fenoles totales.....	59
6.5.2.2 Determinación de antocianinas.....	60
6.5.2.3 Capacidad antioxidante.....	61
6.6 ESTABILIDAD DE COLOR EN GELATINA.....	63
6.7 PRUEBA HEDÓNICA DE GELATINA ADICIONADA CON PIGMENTOS BIOACTIVOS	66
CAPÍTULO 7 CONCLUSIONES	69
CAPÍTULO 8 PERSPECTIVAS	71
CAPÍTULO 9 REFERENCIAS	73
CAPÍTULO 10 ANEXOS	82
Anexo 1. Determinación de fenoles totales	83
Anexo 2. Determinación de antocianinas	85
Anexo 3. Determinación de capacidad antioxidante por el método ABTS ⁺	86
Anexo 4. Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH [*]	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción taxonómica de la col morada.	19
Tabla 2. Contenido de fenoles totales y antocianinas en extractos de <i>B. oleracea</i> obtenidos bajo dos solventes y tiempos de sonicación	46
Tabla 3. Capacidad antioxidante por DPPH [•] y ABTS ^{•+} en extractos de <i>B. oleracea</i> obtenidos bajo dos solventes y tiempos de sonicación.	49
Tabla 4. Coordenadas cromáticas en los extractos de <i>B. oleracea</i> obtenidos bajo dos solventes y tiempos de sonicación.	51
Tabla 5. pH de los extractos de <i>B. oleracea</i> bajo dos solventes y tiempos de sonicación.	53
Tabla 6. Coordenadas cromáticas en tonalidades de antocianinas de <i>B. oleracea</i> en distintos medios de pH.	56
Tabla 7. Rendimiento de extracción de los pigmentos de <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i>	59
Tabla 8. Contenido de fenoles totales y antocianinas en pigmentos bioactivos de <i>B. oleracea</i>	60
Tabla 9. Capacidad antioxidante por DPPH [•] y ABTS ^{•+} en pigmentos de <i>B. oleracea</i>	61
Tabla 10. Puntajes asignados a los atributos sensoriales en la prueba hedónica de gelatinas adicionadas con pigmentos bioactivos de <i>B. oleracea</i>	67
Tabla 11. Preparación de la curva patrón de fenoles totales.	83
Tabla 12. Preparación de la curva patrón de ABTS ^{•+}	86
Tabla 13. Preparación de la curva patrón de DPPH [•]	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de las antocianinas.	13
Figura 2. Estructura de la antocianina en la col morada	20
Figura 3. Coordenadas de color en el sistema Hunter Lab.	29
Figura 4. Secuencia aminoácida típica de la gelatina.	30
Figura 5. Boleta de prueba hedónica de 9 puntos utilizada para evaluar atributos sensoriales en gelatinas adicionadas con pigmentos bioactivos.	43
Figura 6. Extractos de <i>B. oleracea</i> bajo diferentes solventes y tiempos de sonicación. a y b) acuoso con 10 y 20 min; c y d) hidroalcohólico con 10 y 20 min.	52
Figura 7. Gama de colores de las antocianinas de <i>B. oleracea</i> a diferente pHs.	54
Figura 8. Espectro de absorción de antocianinas de <i>B. oleracea</i> en distintos pHs.	55
Figura 9. Diagrama de cromaticidad de espacio de color L*a*b* de las distintas tonalidades de las antocianinas de <i>B. oleracea</i> a diferentes valores de pH.	58
Figura 10. Cinética de la estabilidad de la coordenada L* en los pigmentos bioactivos de <i>B. oleracea</i>	63
Figura 11. Cinética de estabilidad de la coordenada a* de los pigmentos bioactivos de <i>B. oleracea</i>	64
Figura 12. Cinética de la estabilidad de la coordenada b* de los pigmentos bioactivos de <i>B. oleracea</i>	65
Figura 13. Gelatinas adicionadas con los pigmentos bioactivos de <i>B. oleracea</i>	66
Figura 14. Perfil sensorial de la prueba hedónica en gelatinas adicionadas con pigmentos bioactivos.	67
Figura 15. Aceptación de las gelatinas adicionadas con pigmentos bioactivos de <i>B. oleracea</i> . N071 rosa, N067 violeta y N032 azul.	68
Figura 16. Curva patrón de fenoles totales.	84
Figura 17. Curva patrón de ABTS ^{•+}	87
Figura 18. Curva patrón de DPPH [•]	89

RESUMEN

El cuidado de la salud a través de la dieta diaria, ha sido una constante preocupación en los últimos años, por lo que se ha optado por la inclusión de ingredientes más naturales, como los encontrados en frutas y vegetales, que son una rica fuente de antioxidantes que mitigan el daño celular causado por el estrés oxidativo. Por tanto, existe un interés particular en el uso de colorantes obtenidos a partir de fuentes naturales que funcionen como una alternativa a los colorantes sintéticos que se utilizan actualmente. Aunque ya se comercializan varios colorantes naturales, éstos no cubren la demanda del mercado, por lo que es necesaria la evaluación de otras fuentes de obtención de pigmentos naturales.

Las antocianinas de la col morada (*Brassica oleracea* var. *capitata*) son especialmente atractivas debido a sus propiedades químicas, dado que sus pigmentos son capaces de presentar distintas tonalidades de color dependiendo del pH del medio en el que se encuentren, además poseen alta capacidad antioxidante y potenciales aplicaciones, no obstante estos pigmentos solo han sido utilizados con coloraciones rojas. Con base en lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo obtener distintas tonalidades del pigmento bioactivo a partir de col morada y evaluar su aplicación en un producto alimenticio.

Se evaluaron cuatro condiciones de extracción, en las que se probaron dos tiempos de sonicación (10 y 20 min) así como dos solventes distintos (agua y etanol-agua). Comparando la cantidad de compuestos fenólicos extraídos que fueron cuantificados mediante la técnica Folin-Ciocalteu, la capacidad antioxidante por los métodos DPPH[•] y ABTS^{•+}, así como la concentración de antocianinas por la técnica de pH diferencial, se observó que las condiciones de extracción más eficientes para la obtención de dichos compuestos fue el uso de etanol-agua como solvente de extracción y un tiempo de sonicación de 10 minutos.

En el extracto hidroalcohólico con 10 min de sonicación, se encontró la mayor cantidad de fenoles totales (42.37 ± 0.40 mg EAG/g muestra seca) y de antocianinas (7.65 ± 0.09 mg/g muestra seca), así como una capacidad antioxidante de 4.31 ± 0.08 y 7.21 ± 0.05 mmol TEAC/ g muestra seca por DPPH[•] y ABTS^{•+} respectivamente, por lo que se consideró el mejor tratamiento para la extracción de los compuestos de interés y fue elegido para los experimentos posteriores.

El extracto obtenido fue sometido a distintos pH's, observando la gama de colores que presentan las antocianinas con la influencia de este factor. Asimismo se realizó un barrido espectrofotométrico de cada tonalidad y se evaluaron los atributos de color L*, a* y b*, mismos que fueron graficados en el espacio CIELab. Con base en los resultados, se seleccionaron tres colores diferentes (rosa, violeta y azul) del pigmento antociánico ajustando el pH de los mismos.

Los pigmentos obtenidos fueron caracterizados químicamente. Se encontró que el pigmento violeta conservó sus propiedades bioactivas, teniendo una cantidad de fenoles totales de 42.48 ± 0.15 mg EAG/g muestra seca, 7.15 ± 0.01 mg/g de antocianinas y una capacidad antioxidante de 4.15 ± 0.03 y 4.86 ± 0.05 mmol TEAC/g muestra seca por DPPH• y ABTS•⁺, respectivamente. En los pigmentos rosa y azul hubo una disminución de entre 20-70% de estos compuestos. Sin embargo, los pigmentos siguen manteniendo una cantidad apreciable de antocianinas que proveen color y presentan capacidad antioxidante, por lo que se pueden considerar como pigmentos bioactivos.

Los pigmentos bioactivos, rosa, violeta y azul, fueron adicionados en gelatina y se evaluó la estabilidad de su color durante 21 días. Los resultados indican que los pigmentos rosa y violeta son altamente estables y retienen color a través del tiempo, mientras que el pigmento azul resultó ser más inestable, mostrando un cambio drástico de color que va de tonalidades azules hacia tonalidades verdes y amarillas, lo que corresponde con lo descrito en la literatura en la que se menciona que las antocianinas en la región alcalina muestran cambios de color significativos.

Finalmente, la adición de pigmentos bioactivos en gelatina fue sometida a un análisis sensorial con 20 panelistas no entrenados. La gelatina adicionada con el pigmento rosa tuvo el puntaje más alto en los atributos de color (6.95 ± 1.43) y sabor (6.05 ± 1.73), la gelatina adicionada con el pigmento violeta alcanzó el puntaje más alto en textura (7.10 ± 1.71) y olor (6.10 ± 1.55) en una escala de 9 puntos. La gelatina adicionada con el pigmento azul tuvo una baja puntuación en todos los atributos evaluados.

La obtención de pigmentos antociánicos a partir de col morada tienen un alto potencial de aplicación en alimentos, de esta forma es posible obtener pigmentos con propiedades bioactivas y distintas tonalidades a partir de una sola fuente vegetal.

INTRODUCCIÓN

En años recientes, la preferencia en el consumo de ingredientes naturales ha ido en aumento, debido a la búsqueda de un estilo de vida más saludable. Por lo que ha incrementado el interés en el uso de colorantes naturales con el fin de que estos puedan ser una alternativa a los colorantes sintéticos (Castañeda-Ovando y col., 2009; Chengaiah y col., 2010).

El color es uno de los atributos más importantes para juzgar la apariencia y calidad de un producto y así determinar la aceptación o rechazo por el consumidor (Mathias-Retting y Ah-Hen, 2014). Los colorantes juegan un rol importante en los alimentos, especialmente los colorantes naturales que exhiben una amplia gama de colores y de composiciones químicas (Sánchez-Juan, 2013). Sin embargo, son poco estables y difíciles de purificar en escalas industriales, por lo que su uso es aún limitado y se buscan nuevas fuentes para la extracción de los mismos (Lakshmi, 2014; Shamina y col., 2007).

Las antocianinas son un ejemplo de pigmentos extraídos de fuentes naturales y son responsables de una amplia variedad de colores, entre los que destacan el naranja, el rojo, el púrpura y el azul (Castañeda-Ovando y col., 2009). Estas son extraídas de varios frutos y vegetales, sin embargo, en su mayoría son inestables y susceptibles a la degradación por distintos factores. Las antocianinas son abundantes en diversas fuentes vegetales, un ejemplo de ello es la col morada, misma que ha sido valorada por sus propiedades terapéuticas (Castañeda-Ovando y col., 2009).

B. oleracea var. *capitata* es una planta abundante durante todo el año (Podsdek, 2007) y posee un alto valor nutrimental. Es una especie preciada por sus altas concentraciones de compuestos fenólicos con propiedades antioxidantes, como las antocianinas (Wiczowski y col., 2015). Las antocianinas de este vegetal tienen una estructura química característica, lo que les permite tener mayor estabilidad de color (Bakowska-Barczak, 2005).

Estos pigmentos son especialmente atractivos, debido a que muestran color en un amplio rango de valores de pH. Se ha demostrado que en condiciones ácidas está presente el color rojo, virando a colores azules y verdes, incluso amarillos en pH básicos (Dyrby y col., 2001). Esta propiedad, podría extender la gama de colores de los pigmentos antociánicos, ya que actualmente se utiliza como aditivo natural sólo con coloraciones rojas.

Por lo tanto, las antocianinas extraídas de la col morada son una prometedora fuente de pigmentos, sin embargo, su uso como colorantes naturales no se ha formalizado (Badui-Dergal, 2006). Estos pigmentos antociánicos tienen un principal enfoque debido a su abundancia y aplicaciones potenciales como aditivos con valor agregado y su uso como alternativa a los colorantes sintéticos.

Con base en lo anterior, en este trabajo se analizó la gama de tonalidades del pigmento bioactivo de col morada dependiendo del valor de pH y la evaluación de aplicación de distintos tonos en un producto alimenticio. El pigmento obtenido, fue adicionado en gelatina, debido a que este producto se puede encontrar en una gran variedad de colores y en un rango relativamente amplio de pH, razones que la hacen una buena opción como primer acercamiento de la adición de pigmentos antociánicos en una matriz alimenticia y también se evaluó su aceptación mediante un análisis sensorial.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

El color es una propiedad organoléptica que es apreciada por el sentido de la vista, es uno de los atributos más importantes para juzgar la apariencia y calidad de un producto y así determinar la aceptación o rechazo por el consumidor. Por ello, los colorantes tienen un papel importante como aditivos, y son principalmente utilizados en productos alimenticios, fármacos, y cosméticos (Mathias-Retting y Ah-Hen, 2014).

La coloración en los alimentos es una práctica común. La causa de coloración en los alimentos es la presencia de componentes orgánicos propios del alimento, mientras que otros son producidos como consecuencia de reacciones químicas o enzimáticas durante el calentamiento o procesamiento de estos, así como la adición intencionada de colorantes sintéticos (Mathias-Retting y Ah-Hen, 2014; Shamina y col., 2007). Esta práctica es utilizada para resaltar o potenciar el color y recuperar el color original en los alimentos, el cual se ha perdido por la manipulación o procesamiento a los que son sometidos (Sánchez-Juan, 2013).

La adición de color a los alimentos ha sido utilizada durante siglos y ha jugado un rol importante en la apariencia física de los productos. Algunos colorantes naturales obtenidos de animales, raíces, hojas, o flores fueron usados desde tiempos antiguos. Sin embargo, con el desarrollo de la industria alimentaria a finales del siglo XIX, ya se tenía una amplia gama de colores sintéticos. Estos últimos presentan ventajas sobre los naturales porque son altamente estables, proveen mejor uniformidad de color y son de bajo costo (Shamina y col., 2007; Sigurdson y col., 2017).

En los últimos años, ha incrementado significativamente la demanda y el interés por los colorantes extraídos de fuentes naturales (Chengaiyah y col., 2010) y de esta manera reemplazar el uso de colorantes sintéticos. Debido a que la seguridad e inocuidad toxicológica de éstos últimos, ha estado en duda durante las últimas décadas.

Por ello, los desarrollos tecnológicos actuales, se enfocan en alimentos funcionales, que puedan ser fácilmente incluidos en la dieta diaria, adicionando o potenciando la función de sustancias bioactivas que ayuden a prevenir o retrasar la aparición de enfermedades crónicas (Shamina y col., 2007).

1.1 COLORANTES

Los colorantes son sustancias químicas de origen vegetal, animal, mineral o sintético, empleados como aditivo para colorear distintos productos alimenticios con el fin de

recuperar, corregir, intensificar u otorgar color a los alimentos a los que son añadidos (Sánchez-Juan, 2013). Están caracterizados por su habilidad de absorber o emitir luz en el rango visible de 400 a 700 nm. Los pigmentos son moléculas sólidas coloreadas, blancas o negras que se dispersan como partículas en el medio que lo contiene (Gürses y col., 2016) y son parte importante de los colorantes.

Los alimentos absorben y reflejan la luz de forma distinta, propiedad física responsable de la coloración de los alimentos. Los colorantes contienen moléculas disueltas llamadas cromóforos, éstos últimos son capaces de absorber radiaciones luminosas dentro de la región UV-visible. Los cromóforos provocan la excitación electrónica y los electrones se mueven a un nivel de energía más alto de un nivel más bajo, (Gürses y col., 2016, Mathias-Retting y Ah-Hen, 2014) por tanto el color se percibe al ojo humano por el rayo de luz que el alimento rechaza.

1.1.1 Clasificación de los colorantes

Los colorantes pueden clasificarse en dos tipos:

Colorantes artificiales: Son producidos a través de síntesis química.

Los colorantes sintéticos pueden dividirse en:

- a) Colorantes azoicos: Caracterizados por la presencia de un grupo cromóforo azo (-N=N-). Los más comunes son Amarillo No. 5 y No.6, Rojo No. 2, No.4 y No. 40.
- b) Antraquinonas. Conformados por uno o más grupos carboxilo en un sistema de anillos conjugados y tienen al menos tres anillos condensados (Sánchez-Juan, 2013; Badui-Dergal, 2006).

De acuerdo con la FDA, la clasificación de colores certificables está caracterizada de la siguiente manera (Shamina y col., 2007):

- a) FD&C: Aditivos de color utilizados en alimentos, cosméticos y fármacos generalmente.
- b) D&C: Colorantes usados en fármacos y cosméticos.
- c) Ext. D&C: Pigmentos que solamente son usados en fármacos y cosméticos que son aplicados externamente y no pueden ser ingeridos.

Colorantes naturales: Obtenidos de plantas, microorganismos, animales, o minerales.

También pueden clasificarse como hidrosolubles, no solubles, o liposolubles.

1.1.2 Colorantes naturales

Los colorantes naturales, también llamados biocolorantes, son pigmentos obtenidos de fuentes presentes en la naturaleza como plantas, insectos, animales, algas, microorganismos o de fuentes minerales, son utilizados para brindar color a algunos productos (Lakshmi, 2014).

Los colorantes naturales pueden derivarse de una gran variedad de fuentes y por lo tanto exhiben una amplia variedad de composiciones químicas. Sin embargo, éstos poseen baja estabilidad a distintos factores como luz, calor, pH, por tanto éste tipo de colorantes tienden a degradarse, además de que pueden impartir olores o sabores indeseables (Lakshmi, 2014; Shamina y col., 2007).

En la naturaleza, el color es resultado de la presencia de pigmentos naturales como carotenoides, clorofilas, mioglobinas o antocianinas. Son producidos y pueden ser encontrados en semillas, frutos, cortezas, hojas, raíces, tallos, flores y rizomas (Shamina y col., 2007). Se estima que existen cerca de 2000 pigmentos sintetizados por varias plantas, y solo 150 han sido explotados comercialmente (Siva, 2007).

Los pigmentos naturales difieren en su origen y estructura química, y pueden ser clasificados de acuerdo a ello. Los pigmentos de fuentes naturales más utilizados en los alimentos se agrupan en las siguientes categorías (Badui-Dergal, 2006):

- a) Carotenoides.
- b) Clorofilas.
- c) Betalaínas.
- d) Hemopigmentos.
- e) Pigmentos fenólicos: flavonoides, taninos y antocianinas.

Los carotenoides, clorofilas, betalaínas y pigmentos fenólicos, son de origen vegetal, y son resultado de rutas bioquímicas donde se sintetizan compuestos orgánicos, importantes en la fotosíntesis, atracción de polinizadores y protección contra depredadores (Sigurdson y col., 2017). La mayoría de estos pigmentos vegetales están dentro de los plástidos de la célula y en algunos casos en las vacuolas. Mientras que los hemopigmentos son de origen animal (Badui-Dergal, 2006).

El cuidado de la salud, a través de la dieta diaria, ha sido una constante preocupación en los últimos años y se ha optado por la inclusión de frutas y vegetales, que son una rica fuente de antioxidantes que mitigan el daño del estrés oxidativo. Por tanto, existe un interés particular en pigmentos con propiedades antioxidantes como los flavonoides, carotenoides y antocianinas para así reducir la incidencia de enfermedades crónicas degenerativas (Badui-Dergal, 2006; Shamina y col., 2007).

1.1.2.1 Carotenoides

Los carotenoides son un grupo de pigmentos orgánicos liposolubles, su coloración va de amarillo a rojo intenso. Están constituidos por unidades de isoprenoide unidos por dobles enlaces conjugados, lo que explica su color intenso. Aunque la absorción de luz depende del número de enlaces conjugados, éste espectro está entre 400 a 500 nm. Se estima que existen más de 600 tipos de carotenoides ampliamente distribuidos en la naturaleza. Solo las plantas superiores, algunos procariotes y hongos son capaces de sintetizarlos. Además de proveer color, algunos carotenoides contribuyen a la ingesta diaria de vitamina A. Entre los más comunes se encuentra el β -caroteno, α y γ -caroteno y el licopeno (Sigurdson y col., 2017; Shamina y col., 2007; Yasuf y col., 2017).

1.1.2.2 Clorofilas

Las clorofilas son pigmentos verdes liposolubles, responsables del color de las hojas de las plantas, algas o cianobacterias que las contienen. Son necesarias en la fotosíntesis, proceso en el cual se transforma la energía solar en energía química dentro de los cloroplastos de las hojas. Su estructura consta de un tetrapirrol cíclico simétrico con un ión de magnesio centralizado, que está unido a un fitol. Las principales materias colorantes en las clorofilas son las feofitinas y clorofila magnésica, las cuales absorben luz en un rango de 475 a 525 nm. Dependiendo del contenido de magnesio, su color va desde verde olivo hasta verde oscuro, sin embargo son sensibles a la luz, oxígeno y acidez, por tanto no resisten largos tiempos de almacenamiento, por lo que son poco empleadas como aditivos alimentarios. Las más comunes son la clorofila A (azul-verde) y la clorofila B (amarillo-verde) (Lakshmi, 2014; Sigurdson y col., 2017).

1.1.2.3 Betalainas

Las betalainas, son una clase de pigmentos hidrosolubles sintetizados y acumulados en las vacuolas de frutos, flores y hojas de plantas del orden Caryophyllales. Se dividen en dos clases: betacianinas (rojo-violeta) y en betaxantinas (amarillas). Las betacianinas

absorben luz a 537 nm, mientras que las betaxantinas a 480 nm. Son componentes N-heterocíclicos, tienen estructuras de glucósidos derivados del ácido betalámico. Las betalaínas son estables en un rango de pH de 3 a 7, por lo que son comúnmente aplicados en alimentos de baja acidez o neutros. La baja estabilidad de las betalaínas limita su aplicación a productos de vida útil corta, almacenamiento a bajas temperaturas y envases ámbar, por ello se usan aditivos como antioxidantes, agentes quelantes, azúcares o proteínas para incrementar su estabilidad (Badui-Dergal, 2006; Sigurdson y col., 2017; Yasuf y col., 2017).

1.1.2.4 Hemopigmentos

El color rojo en las carnes se debe a los hemopigmentos, que son hemoglobina y mioglobina (Badui-Dergal, 2006).

1.1.2.5 Pigmentos fenólicos

Los pigmentos fenólicos son sustancias con uno o más anillos aromáticos y al menos un grupo hidroxilo. Existen más de 800 compuestos fenólicos identificados que se encuentran distribuidos en varias frutas y vegetales. Tienen funciones estructurales y metabólicas en los frutos que los contienen. Además, intervienen como antioxidantes naturales en los alimentos, teniendo un gran interés nutricional por su contribución a la salud humana (Badui-Dergal, 2006; Porras-Loaiza y López-Malo, 2009).

1.1.2.5.1 Flavonoides

Los flavonoides (del latín *flavus*, amarillo), son un grupo de compuestos fenólicos que proveen colores como amarillo, naranja, rojo y azul. Son solubles en agua, metanol y etanol. Están caracterizados por un núcleo flavilo como aglucón al cual se une una fracción de azúcar por un enlace β -glucosídico, pero pueden tener estructuras simples o muy complejas, debidas a la polimerización. Se encuentran en diversos frutos junto con las antocianinas ya que ambos pigmentos siguen un proceso biosintético común (Badui-Dergal, 2006; Yasuf y col., 2017).

1.1.2.5.2 Taninos

Los taninos, son una clase de compuestos fenólicos incoloros o café-amarillo, con sabor astringente y amargo. Son solubles en agua, alcohol y acetona, además tienen un peso molecular comprendido entre 500 a 3,000 Da. Estos compuestos contienen un número importante de grupos hidroxilo entre otros grupos funcionales, siendo capaces de unirse

a proteínas y otras macromoléculas. Se clasifican en dos grupos: taninos hidrolizables y no hidrolizables o condensados. Los taninos también se consideran como antioxidantes, con capacidad de atrapar radicales libres. Son obtenidos de varias partes de las plantas como frutos, vainas, hojas, cortezas de árbol, maderas y raíces. Los taninos tienen un papel importante en el teñido porque mejora la afinidad de las fibras hacia distintos pigmentos naturales (Badui-Dergal, 2006; Porras-Loaiza y López-Malo, 2009; Yasuf y col., 2017).

1.1.2.5.3 Antocianinas

Las antocianinas (del griego *anthos*, flor y *kianos*, azul), pertenecientes a los flavonoides, son un grupo de pigmentos polifenólicos naturales responsables de una amplia gama de colores que comprende el rojo, naranja, púrpura, violeta, azul y verde. Están presentes en frutos, flores, hojas de algunas plantas, y comúnmente se encuentran en la solución vacuolar de células epidérmicas (Castañeda-Ovando y col., 2009).

Son el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles, y están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se encuentran en al menos 27 familias, 73 géneros y una gran cantidad de especies de plantas (Bridle y Timberlake, 1997). Estos pigmentos cumplen importantes funciones biológicas en las plantas, como la protección contra el estrés biótico y abiótico y atraen a insectos para la polinización y dispersión de las semillas (Xu y col., 2014).

A pesar de tener pocos grupos cromóforos (Badui-Dergal, 2006), se han identificado al menos 500 estructuras moleculares (Konczak y Zhang, 2004). La gran variedad de antocianinas, las hacen un grupo complejo e interesante.

1.1.2.5.3.1 Estructura de las antocianinas

Las antocianidinas (o agliconas) son la estructura básica de las antocianinas. Consiste en un anillo aromático [A], unido a un anillo heterocíclico [C] que contiene oxígeno, el cual está unido por un enlace carbono-carbono a un tercer anillo aromático [B] (Fig. 1) (Konczak y Zhang, 2004).

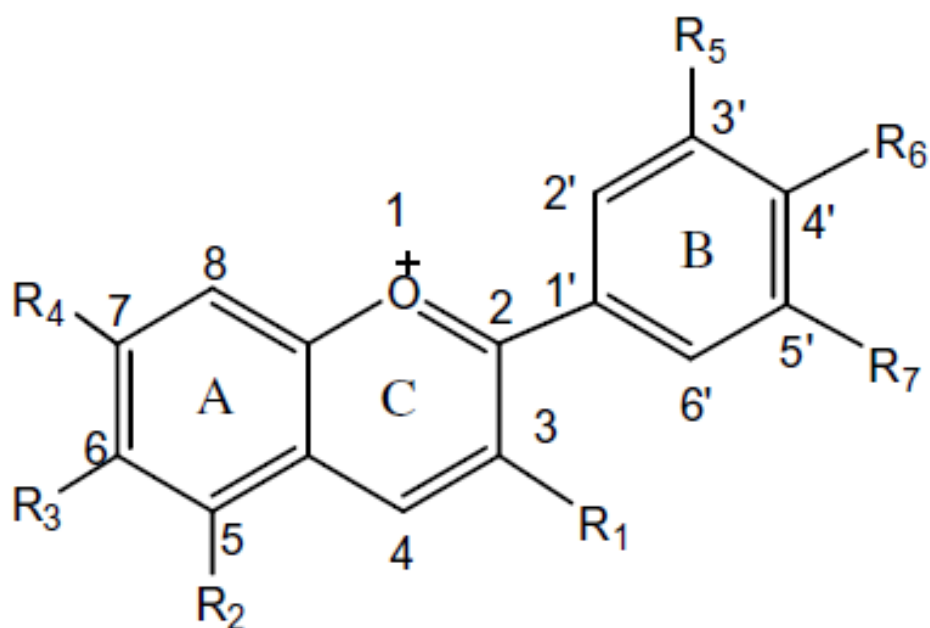


Figura 1. Estructura general de las antocianinas. Fuente: Castañeda-Ovando y col. (2009).

Cuando las antocianidinas se encuentran en su forma glucosilada, es decir, están unidas a una fracción de un carbohidrato a través de un enlace β -glucosídico, son llamadas antocianinas y es el catión flavilo quien causa la intensidad de su color (Castañeda-Ovando y col., 2009).

Todas las antocianinas están hidroxiladas en las posiciones 3, 5 y 7, pero difieren en la sustitución del anillo. Sólo se han encontrado cinco azúcares que forman parte de la molécula, en orden de abundancia son glucosa, ramnosa, galactosa, xilosa y arabinosa, y ocasionalmente, gentiobiosa, rutinosa y soforosa. Normalmente, los monosacáridos se unen a los grupos hidroxilo de la posición 3, mientras que los disacáridos lo hacen con hidroxilos 3 y 5, o bien en las posiciones 3 y 7 (Badui-Dergal, 2006; Timberlake, 1980).

Las antocianinas están caracterizadas por complejos patrones de hidroxilación, metoxilación, glicosilación y acilación; dichos factores están ligados a distintas especies de plantas para así formar los patrones característicos de las antocianinas (Wiczowski y col., 2015). Cuando en una misma molécula se encuentran dos glúcidos, generalmente se encuentran acilados con ácidos cinámicos (p-cumárico, caféico y ferrúlico) y con ácidos alifáticos (acético, malónico y succínico) e hidroxibenzoicos. La acilación no tiene efecto de color, pero hace más estable al pigmento (Timberlake, 1980).

Existe una gran variedad de antocianinas esparcidas en la naturaleza. Se conocen al menos 23 antocianidinas, las 6 más comunes son pelargordina, delphinidina, cianidina, petunidina,

peonidina y malvidina. La combinación de éstas con los diferentes azúcares genera alrededor de 500 antocianinas, las diferencias entre ellas es el número de grupos hidroxilo, el grado de metilación de estos grupos, así como la naturaleza y el número de ácidos aromáticos y alifáticos presentes en la molécula (Castañeda-Ovando y col., 2009).

La presencia de los derivados 3-glucósidos es más frecuente que los 3,5- y 3,7-diglucósidos, por tanto, la antocianina más común es la cianidina-3-glucósido (McDougall y col., 2007).

1.1.2.5.3.2 Estabilidad de las antocianinas

Las antocianinas son altamente inestables y muy susceptibles a la degradación. Su estabilidad se ve afectada por muchos factores incluyendo la estructura y concentración del pigmento, pH, temperatura, intensidad de luz, presencia de co-pigmentos, enzimas, iones metálicos, oxígeno, azúcares y productos de su degradación (Castañeda-Ovando y col., 2009; Valencia-Arredondo, 2015).

A pesar de que las antocianinas abundan en la naturaleza, no se ha formalizado su uso como colorantes naturales, ya que son poco estables y difíciles de purificar (Badui-Dergal, 2006). Por ello, la estabilización química de éstos pigmentos antociánicos, tienen un principal enfoque debido a su abundancia y aplicaciones potenciales, sus efectos benéficos a la salud y su uso como alternativa al uso de colorantes artificiales (Castañeda-Ovando y col., 2009).

1.1.2.5.3.2.1 Efecto del pH en las antocianinas

Las antocianinas se pueden encontrar con distintas estructuras químicas dependiendo del pH del medio (Castañeda-Ovando y col., 2009). El núcleo flavilo es deficiente en electrones, por lo que es muy reactivo y esto hace a las antocianinas poco estables. Además, su color cambia en función de la estructura que se encuentre en mayor proporción a determinado valor de pH (Badui-Dergal, 2006; Valencia-Arredondo, 2015).

Las diferentes coloraciones de las antocianinas se deben a la conversión del catión flavilo a formas secundarias, así como a interacciones moleculares (Badui-Dergal, 2006). En soluciones acuosas, existen cuatro diferentes estructuras químicas de las antocianinas, reversiblemente varían en concentración a través de la escala de pH y tienen diferentes espectros de absorción (Galanakis, 2017).

A pH 1.0, la especie predominante es el catión flavilo (rojo), el cual contribuye a los colores rojo y púrpura. A valores de pH entre 2.0 y 4.0, se presenta la especie quinoidal azul anhidra. A valores de pH entre 5.0 y 6.0, se pueden observar dos especies incoloras, pseudobase-carbinol y chalcona respectivamente. Y a valores de pH mayores a 7, las antocianinas suelen degradarse dependiendo de sus grupos sustituyentes (Castañeda-Ovando y col., 2009).

A valores de pH entre 4.0 y 6.0, coexisten las cuatro formas estructurales de las antocianinas. Cuando el pH incrementa, también incrementa la cantidad de bases anhidras, mientras que en condiciones ácidas, la especie predominante es el ión flavilo (Castañeda-Ovando y col., 2009).

La estabilidad de las antocianinas y la variación en su color a diferentes valores de pH está influenciada por los sustituyentes del anillo B y la presencia de grupos hidroxilo o metoxilos. Los cambios son más significativos en la región alcalina (Castañeda-Ovando y col., 2009).

1.1.2.5.3.2.2 Efecto de co-pigmentación en las antocianinas

La co-pigmentación, es el fenómeno por el cual los pigmentos interactúan con otros componentes orgánicos incoloros, iones metálicos o asociaciones complejas, que generan un cambio o incremento en la intensidad de color (Castañeda-Ovando y col., 2009). La asociación de las antocianinas con otros co-pigmentos las protegen de la degradación por luz, calor o pH (Valencia-Arredondo, 2015).

Algunas moléculas capaces de actuar como co-pigmentos son: flavonoides, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos, metales, nucleótidos, polisacáridos y otros fenoles. Generalmente los co-pigmentos son incoloros, pero cuando se mezclan con las antocianinas, se produce un efecto hipercromático (incremento en la absorbancia a una longitud de onda visible) y un cambio batocrómico (desplazamiento a longitudes de onda mayores del máximo de absorbancia) en el espectro de absorción de luz (Badui-Dergal, 2006).

La interacción entre las antocianinas y los co-pigmentos puede llevarse a cabo por diferentes vías. Cuando la asociación es con otra molécula idéntica se conoce como auto-asociación. Cuando se une a los grupos sustituyentes de la misma molécula de la antocianina se forma una co-pigmentación intramolecular. Cuando la antocianina se une

a otra molécula toma lugar una co-pigmentación intermolecular (Badui-Dergal, 2006; Castañeda-Ovando y col., 2009; Wiczowski y col., 2015).

La magnitud del efecto de co-pigmentación es evidente a bajas condiciones de acidez (pH 4.0-6.0), ya que todas las antocianinas existen como estructuras incoloras a menos que haya un mecanismo de interacción que le dé mayor estabilidad, principalmente con la unión a grupos glucosídicos o acilo. Por tanto, las antocianinas aciladas y con alto grado de glucosilación son una potencial fuente de colorantes y componentes bioactivos que pueden mantener su estabilidad ante este factor (Badui-Dergal, 2006; Wiczowski y col., 2015).

1.1.2.5.3.2.3 Efecto de la temperatura en la estabilidad de las antocianinas

Las antocianinas presentan baja estabilidad durante el procesamiento térmico y almacenamiento. El calor tiene un alto impacto en la calidad de su color y podría afectar sus propiedades bioactivas (Castañeda-Sánchez y Guerrero-Beltrán, 2015; Patras y col., 2010). La magnitud y duración de calentamiento de los pigmentos antociánicos aceleran su degradación (Patras y col., 2010). Por lo tanto, la estabilidad de las antocianinas se encuentra directamente influenciada por la temperatura.

El incremento de la temperatura en las antocianinas, causa su rápida degradación. Los posibles mecanismos por los que existe una destrucción térmica pueden ser: (1) hidrólisis del enlace 3-glucosídico que causa la pérdida del color rojo (Jackman y Yada, 1987), (2) ruptura hidrolítica del anillo heterocíclico con la consecuente conversión de la aglicona a chalconas incoloras (Astrid-Garzón, 2008; Castañeda-Sánchez y Guerrero-Beltrán, 2015), y por tanto la destrucción del cromóforo de la antocianina, que da precipitados color café por su naturaleza polifenólica (Badui-Dergal, 2006).

Las reacciones de equilibrio entre las estructuras antociánicas tiende a ser endotérmicas, en una dirección de izquierda a derecha:

Base quinoidal (azul) ↔ Cation flavilo (rojo) ↔ Base carbinol (incolora) ↔ Chalcona

A altas temperaturas el equilibrio cambia hacia la chalcona, sin embargo el retorno hacia el cation flavilo es muy lento (Jackman y Yada, 1987; Timberlake, 1980).

Por otro lado, la acilación de la molécula de antocianina puede mejorar su estabilidad. También, la metoxilación de la fracción acilo mejora la integridad estructural ante el

calor, por lo que las antocianinas poliglicosiladas y poliaciladas mejoran su estabilidad ante factores como cambios de pH, calor o luz (Patras y col., 2010).

Sin embargo, el mecanismo de descomposición de antocianinas, mediado por el aumento de temperatura de procesamiento y almacenamiento, depende en gran medida de la naturaleza de las antocianinas y de las fuentes de donde son extraídos (Jackman y Yada, 1987)

1.1.2.5.3.2.4 Efecto de la luz en la estabilidad de las antocianinas

La luz es un factor que acelera el proceso de degradación de las antocianinas, sin embargo, también es capaz de acelerar la biosíntesis de éstas (Castañeda-Sánchez y Guerrero-Beltrán, 2015). Asimismo, la temperatura y el oxígeno molecular son factores que actúan conjuntamente en la degradación de las antocianinas por luz. Similar a la degradación por altas temperaturas, la degradación de las antocianinas por luz sigue una cinética de primer orden (Attoe y Von Elbe, 1981)

La fotodegradación de antocianinas, comienza con el catión flavilo a través de la pseudobase de carbinol a la chalcona, aunque también puede ocurrir la fotodegradación directa del catión flavilo (Attoe y Von Elbe, 1981).

Las antocianinas que presentan sustituyentes en el hidroxilo 5' son más susceptibles a la degradación por luz (Castañeda-Sánchez y Guerrero-Beltrán, 2015). Por otra parte, los diglucósidos acilados y metilados reducen su susceptibilidad a la luz, mientras que las antocianinas no aciladas son menos estables, al igual que las monoglicósiladas (Markakis y Jurd, 1974).

1.1.2.5.3.2.5 Actividad antioxidante de las antocianinas

La actividad antioxidante es la capacidad de los compuestos fenólicos para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo, algunos compuestos fenólicos como los flavonoides y las antocianinas presentan dicha propiedad (Shahidi y Zhong, 2015). Las antocianinas son un fascinante grupo de metabolitos secundarios, ya que además de su habilidad para impartir colores vibrantes, poseen propiedades antioxidantes y terapéuticas, siendo su estructura fenólica la responsable de dicha propiedad (Konczak y Zhang, 2004).

Se ha sugerido que el contenido de antocianinas y su actividad antioxidante contribuye al efecto protector contra enfermedades degenerativas de muchas frutas y verduras

(Castañeda-Ovando, 2009). Por las propiedades de las antocianinas, se pretende popularizar su aplicación como colorantes naturales con propiedades bioactivas (Konczak y Zhang, 2004).

En la naturaleza existen muchas fuentes potenciales de antocianinas que pueden ser utilizadas como colorantes, entre ellas se encuentran frutos coloreados como uvas (*Vitis sp.*), cerezas (*Prunus cerasus*), frutos rojos, ciruela roja (*Prunus cerasifera*) y granadas (*Punica granatum*), en algunas hojas como la jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), así como verduras con colores oscuros como la cebolla morada (*Allium cepa*), rábano rojo (*Raphanus sativus*), berenjena (*Solanum melongena*), papa dulce morada (*Ipomoea batatas*), maíz azul (*Zea mays*) y col morada (*Brassica oleracea*) (Bridle y Timberlake, 1997; He y Giusti, 2010).

1.2 GENERALIDADES DE LA COL MORADA (*Brassica oleracea* var. *capitata*)

La col morada (*Brassica oleracea* var. *capitata*), es miembro de la familia Brassicaceae, es una planta comestible de fuerte y característico sabor, que es abundante durante todo el año. El nombre común de la col deriva del francés *caboché* que significa “cabeza” (WCSP, 2018).

Esta hortaliza ha sido valorada por sus propiedades nutricionales, ya que posee un alto valor nutrimental, es una rica fuente de fibra, vitaminas, minerales y de un gran número de sustancias bioactivas. La col morada es una de las especies de *Brassica* más apreciada por contener altas concentraciones de antioxidantes y por su uso como colorante natural. Su vida media es de 2 a 3 semanas, lo que le permite estar fresca y ser fácilmente almacenada (Valencia-Arredondo, 2015; Wiczkowski y col., 2015).

1.2.1 Origen y distribución de *Brassica oleracea* var. *capitata*

B. oleracea var. *capitata*, es una de las hortalizas más antiguas que se conocen, ha sido cultivada por los últimos 2,000 años. Es una especie nativa de la región del Mediterráneo y el sureste de Europa, así como en el norte y sur de Inglaterra (Draghici y col, 2013; WCSP, 2018). Actualmente crece en muchas regiones alrededor del mundo, principalmente en climas fríos.

1.2.2 Taxonomía

A continuación, se describe la taxonomía de la col morada (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción taxonómica de la col morada.

Taxonomía	Nomenclatura
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Brassicales</i>
Familia	<i>Brassicaceae</i>
Género	<i>Brassica</i>
Especie	<i>Brassica oleracea</i>

Fuente: WCSP, 2018.

1.2.3 Características botánicas

B. oleracea var. *capitata* es una planta bianual, donde su primer ciclo de vida corresponde a la fase vegetativa donde se forma el tallo ancho y corto. La fase reproductiva da como resultado la producción de uno o más tallos florales (Hurrell y col., 2009).

Es una planta de forma esférica que alcanza entre los 30 o 40 cm de altura, con tallo corto, suave y erecto relativamente leñoso, raíz profunda y gruesa pero no dominante. Está caracterizada por tener hojas grandes y carnosas cortamente pecioladas, de color azul-verdosas, con nervaduras muy notables y márgenes ondulados que se superponen una a otra formando una bola o “cabeza” compacta. Al tacto se siente firme y dura, lo que constituye su parte comestible. La superficie foliar está recubierta de ceras epicuticulares que dificultan la entrada de agua. Además, presenta hojas más bajas y grandes (de hasta 45 cm de largo) con formas rizadas e irregulares (WCSP, 2018).

La col morada es un vegetal que contiene una alta cantidad de vitaminas, entre las que destacan la vitamina C, vitaminas del complejo B (B1, B2, B3, B5, B7 y B9), vitamina E y vitamina K. Entre los minerales que posee se encuentran el selenio, potasio, fósforo y magnesio, además de calcio, yodo, zinc y hierro. Asimismo posee una compleja mezcla de fitoquímicos que le confieren propiedades antioxidantes. Sin embargo, el grupo más diverso de polifenoles en esta especie son los flavonoides, principalmente las antocianinas (Cartea y col., 2011).

B. oleracea var. *capitata*, es una rica fuente de antocianinas mismas que le brindan su color púrpura característico y tienen un impacto benéfico en la salud humana (Valencia-Arredondo, 2015).

1.2.4 Antocianinas de *B. oleracea* var. *capitata*

B. oleracea var. *capitata* es una hortaliza que ha atraído mucha atención, no sólo por su valor nutrimental, también por su potencial uso como colorante natural, con el fin de reemplazar los colorantes rojos sintéticos utilizados actualmente como aditivos (McDougall y col., 2007).

Las antocianinas son un grupo de metabolitos secundarios encontrados en mayor concentración en la col morada. Estos compuestos son los responsables de la formación de su color púrpura intenso y de la actividad antioxidante que posee (Konczak & Zhang, 2004).

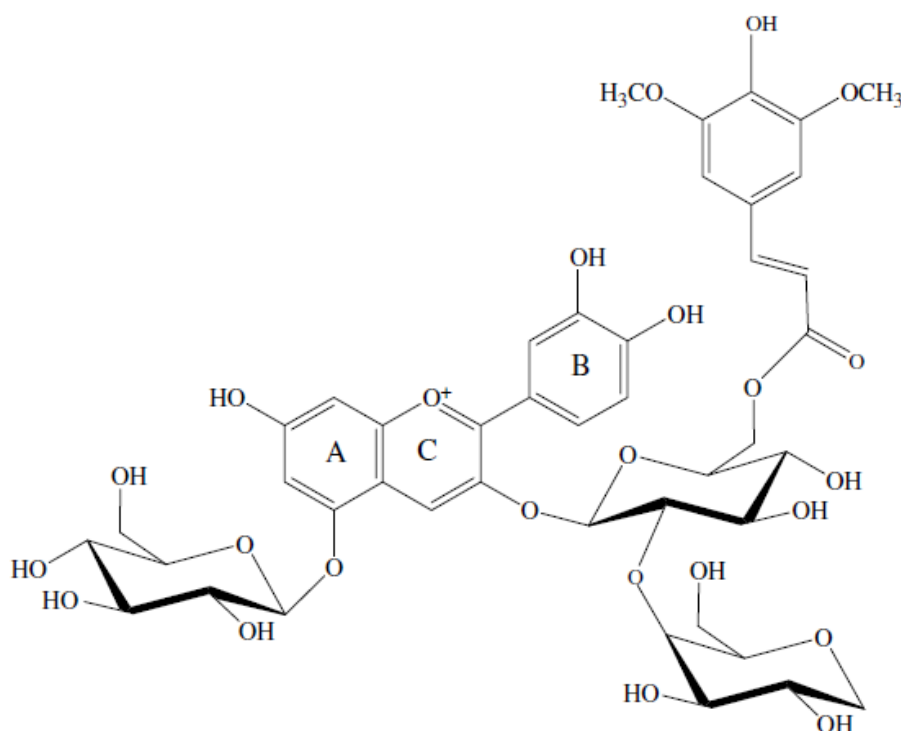


Figura 2. Estructura de la antocianina en la col morada. Fuente: McDougall y col. (2007).

La col morada contiene antocianinas con patrón estructural característico. Su principal estructura está compuesta por un núcleo de cianidina-3-O-diglucósido-5-O-glucósido (Fig. 2) que puede ser no acilada, sin embargo, los derivados más dominantes son las formas monoaciladas o diaciladas con ácidos cinámicos (McDougall y col., 2007). Se ha reportado que la col morada puede contener entre 9 y 24 antocianinas diferentes (Volden

y col., 2008). Estos compuestos cubren al menos el 68% del total de antocianinas contenidas en la col morada (Wiczowski y col., 2015).

La glucosilación y el tipo de acilación en las antocianinas de la col morada, le permite tener ese color en sus pigmentos y afecta la actividad antioxidante de sus componentes (Wiczowski y col., 2013).

Generalmente, las antocianinas de la col morada tienen mejor estabilidad comparada con las antocianinas contenidas en otras fuentes naturales. Esta propiedad es atribuida a la compleja estructura química de las antocianinas de este vegetal, ya que la mayoría de ellas son aciladas, tienen un alto grado de glicosilación y un gran número de ácidos aromáticos unidos, lo que les permite tener una co-pigmentación intramolecular y/o intermolecular, así como reacciones de auto-asociación (Bakowska-Barczak, 2005).

Por otro lado, las antocianinas de la col morada son especialmente atractivas debido a que muestran color en un amplio rango de valores de pH. A pH 3.0 son de color rosa, violeta a pH 5.0, mientras que a pH 7.0 tienen una coloración azul (Dyrby y col., 2001). La inusual estabilidad del color de las antocianinas de la col morada ante cambios de pH, se debe a la presencia de grupos acilo que impiden la hidrólisis de la forma catiónica del flavilo rojo a la base incolora carbinol, permitiendo la formación de la base quinoidal azul (Bridle y Timberlake, 1997). La glicosilación en las posiciones 3' y 5' hacen que el color cambie a través de la base quinoidal azul (McDougall y col., 2007).

Se ha demostrado que las antocianinas de *B. oleracea* var. *capitata* tienen baja sensibilidad a la fotodegradación si éstas se encuentran en pH de 3.0-7.0, por lo tanto este tipo de antocianinas son estables en soluciones neutras y ligeramente ácidas (Dyrby y col., 2001; Jin-Yuarn y col., 2008). Comparado con las betalaínas, las antocianinas muestran mejor estabilidad cuando son expuestas a luz UV y a altas temperaturas (Bruno y col., 2012). El incremento de estabilidad ante factores como el calor o cambios de pH, se debe principalmente al grado de acilación de las antocianinas y a la co-pigmentación intramolecular en la que se encuentran.

La alta estabilidad térmica de las antocianinas, es debida a la protección del catión flavilo a través de la co-pigmentación (Dyrby y col., 2001). Las antocianinas de la col morada son más estables en altas temperaturas, muestran un decremento de absorbancia a 530 nm durante los primeros 30 minutos, teniendo un decremento de absorbancia gradual casi lineal después de ese tiempo (Sapers y col., 1981). Jin-Yuarn y col. (2008) reportaron que

el calentamiento del extracto de col morada, no disminuyó la absorbancia en las antocianinas, sin embargo el calor provocó la pérdida de agua, lo que provocó que aumentará ligeramente la absorbancia.

Volden y col. (2008) reportaron que existen pérdidas en el contenido de antocianinas de la col morada, dependiendo del tipo de procesamiento térmico al que son sometidas; corroborando la degradación de antocianinas por el calor. Sin embargo, no necesariamente el calor es causante de la degradación de antocianinas, sino que también el pH en el que se encuentre la muestra.

Wiczowski y col. (2015) demostraron que el procesamiento de la col morada como la fermentación, condiciones de almacenamiento y de cocción reducen la concentración de antocianinas, comparada con la col fresca y por tanto también disminuye su capacidad antioxidante. El grado de pérdida depende en gran medida del tipo y tiempo de procesamiento.

Las antocianinas que contiene *B. oleracea* var. *capitata*, son altamente estables y son una buena fuente de sustancias bioactivas. Son utilizadas como colorante natural en alimentos con pH neutro o ligeramente alcalino, como postres en polvo, productos lácteos y bebidas de frutas y vegetales, también han sido usadas como indicador de pH en formulaciones farmacéuticas (Jin-Yuarn y col., 2008; Mizgier y col., 2016). Las antocianinas de *B. oleracea* var. *capitata* muestran propiedades bioactivas, pero aún es importante llevar a cabo procesos para la remoción de sustancias que le proporcionan fuerte aroma y sabor, así como la mejora en su estabilidad ante distintos factores durante el procesamiento, lo que los convertiría en colorantes prometedores por sus múltiples cualidades (Dyrby y col., 2001).

1.4 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes, son moléculas que al estar presentes en bajas concentraciones, son capaces de retardar o prevenir la oxidación (pérdida de electrones) de otro sustrato (Venereo-Gutiérrez, 2002).

El sistema antioxidante evita alteraciones de biomoléculas importantes en la célula, ya que actúan como eliminadoras (scavengers) de especies reactivas. Estos antioxidantes, ceden un electrón al radical libre con el que interactúa y estos se oxidan formando un radical libre no tóxico, con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante,

a favor de éstos últimos (Venereo-Gutiérrez, 2002). La oxidación de biomoléculas puede deberse a los radicales libres, o aquellas especies suficientemente reactivas para inducir este proceso.

Los radicales libres son aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, lo que les da gran inestabilidad, además son muy reactivos y tienen una vida media corta. Estos radicales son generados en las células como resultado de reacciones metabólicas, por tanto, los antioxidantes son capaces de neutralizar dichas especies reactivas del oxígeno (ROS), algunos ejemplos son (Valencia-Arredondo, 2015; Venereo-Gutiérrez, 2002):

- * Superóxido (O_2^-).
- * Oxígeno simple (O_2).
- * Peróxido (ROO^-).
- * Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).
- * Oxígeno nítrico (NO).

En condiciones celulares normales, existe un equilibrio entre la producción de radicales libres u otras especies reactivas con los mecanismos antioxidantes, sin embargo, cuando los radicales libres o ROS tienen una proliferación descontrolada se rompe este equilibrio en favor de los prooxidantes, lo que provoca el llamado estrés oxidativo, causando daños en enzimas y material genético (Dudonné y col., 2009).

1.4.1 Clasificación de los antioxidantes

El estrés oxidativo, depende en gran medida de los eficaces sistemas antioxidantes presentes en el organismo y se pueden clasificar en (Galván y col. 2008):

- a) *Sistemas antioxidantes primarios*: Previenen el fenómeno oxidativo impidiendo la formación de radicales libres o eliminando los agentes oxidantes. En este grupo se incluyen enzimas como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GP), catalasa (CAT) y DT-diaforasa, además de moléculas como vitamina E, ácido ascórbico, carotenos y ácido úrico.
- b) *Sistemas antioxidantes secundarios*: Actúan de forma complementaria a los primarios eliminando los productos nocivos formados durante la oxidación, impidiendo así su acumulación. En este grupo, se encuentran enzimas de reparación

del ADN, exonucleasas y endonucleasas, enzimas proteolíticas, enzimas lipolíticas y transferasas.

Existen distintas formas para clasificar a los antioxidantes, de acuerdo con su origen y presencia en el organismo, pueden distinguirse los antioxidantes que son sintetizados propiamente por el organismo (endógenos) y aquellos que pueden adquirirse mediante la dieta (exógenos) (Venereo-Gutiérrez, 2002).

- Endógenos, pueden ser enzimáticos (SOD, CAT, GPx, etc.) y no-enzimáticos (glutación, coenzima Q, ácido tioctico, etc.).
- Exógenos (vitamina E, vitamina C, betacarotenos, flavonoides, licopenos, albúmina, y antocianinas).

1.4.2 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante es la habilidad que tienen ciertas sustancias (donadores de H^+ o e^-) para reducir o eliminar especies oxidantes, que producen daños a moléculas como carbohidratos, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Quintanar-Escorza y Calderón-Salinas, 2009).

Las especies oxigénicas reactivas o radicales libres que se producen, pueden escapar de los sistemas de defensa antioxidante, produciendo continuamente irremediables daños de importancia biológica con consecuencias como:

- a) Daño a los ácidos nucleicos: Los radicales libres pueden modificar las bases nitrogenadas, lo que induce mutaciones y por tanto carcinogénesis, ya sea por la pérdida de expresión o por síntesis de una proteína alterada.
- b) Daño a las proteínas: Los ROS pueden inducir la inactivación y desnaturalización de proteínas, además de alteraciones que pueden modificar su función.
- c) Daño a los lípidos: Se produce peroxidación lipídica, provocando así pérdida de la permeabilidad, fluidez e integridad de la membrana plasmática y de los organelos celulares.
- d) Daño a los carbohidratos: Este grupo es dañado en menor proporción que otras moléculas, sin embargo, a causa de la oxidación pueden fragmentarse en unidades más sencillas, alterando funciones celulares como las asociadas a la formación de prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores.

El organismo también utiliza los radicales libres para la destrucción de bacterias y patógenos invasores (Quintanar-Escorza y Calderón-Salinas, 2009).

1.4.3 Cuantificación de la actividad antioxidante

Los métodos de determinación de actividad antioxidante total frecuentemente son indirectos y por inhibición. La mayoría de los ensayos emplean el mismo principio, el cual consiste en un radical libre sintético y la habilidad de la muestra biológica para eliminar o reducir dicho agente oxidante. La intensidad de inhibición es monitoreada por espectrofotometría aplicando un estándar adecuado, que puede ser ácido (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX) ó Vitamina C, para así cuantificar la capacidad antioxidante (Floegel y col., 2011; Quintanar-Escorza y Calderón-Salinas, 2009).

En la mayoría de los métodos de evaluación de actividad antioxidante no se emplean especies radicales de significado biológico, sino radicales oxidantes iniciadores ajenos, no fisiológicos. Los distintos ensayos, difieren en el agente oxidante, el sustrato empleado, el tiempo de evaluación, la técnica instrumental utilizada, la sensibilidad de la prueba, y las interacciones de la muestra con el medio de reacción (Quintanar-Escorza y Calderón-Salinas, 2009).

En los últimos años, un amplio rango de ensayos han sido utilizados para medir la capacidad antioxidante total, los más populares son (Floegel y col., 2011):

- a) Método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]).
- b) 2',2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS^{•+}).
- c) Ensayo ORAC (por sus siglas en inglés, Oxigent Radical Absorbance Capacity).
- d) Ensayo FRAP (por sus siglas en inglés, Ferric -Reducing Antioxidant Power).
- e) Ensayo TRAP (Total Peroxyl Radical-Trapping Potential).

Algunos métodos están basados en la transferencia de un electrón (ABTS, DPPH y FRAP), mientras que otros involucran la transferencia de un átomo de hidrógeno (ORAC) (Floegel y col., 2011).

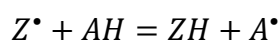
1.4.3.1 Método DPPH[•]

El método DPPH[•] fue desarrollado por Marsden S. Blois en 1958, con el objetivo de determinar la actividad antioxidante mediante el uso de un radical libre (Kedare y Singh, 2011). Este ensayo evalúa la capacidad de captación de antioxidantes hacia el radical libre

estable 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]). El radical, se reduce a su hidrazina correspondiente cuando reacciona con los átomos de hidrógeno de los antioxidantes (Sánchez-Moreno, 2002).

El radical DPPH[•] está caracterizado por ser estable a pesar de la deslocalización del electrón libre, dicha cualidad también le brinda el color violeta intenso (Kedare y Singh, 2011). La técnica más utilizada es por decoloración, en la que se mide el decremento de absorbancia a 520 nm, producida por la adición de un compuesto antioxidante que da lugar a la forma reducida del DPPH[•] en un medio metanólico, por lo tanto la disminución es proporcional a la capacidad de la muestra para neutralizar el radical (Kedare y Singh, 2011; Martínez-Cruz y col., 2011).

Representado el radical DPPH[•] como Z^{\bullet} , y la molécula donadora como AH , la reacción es:



Donde ZH es la forma reducida y A^{\bullet} el radical libre producido que puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (Kedare y Singh, 2011).

Este método posee varias ventajas ya que el radical DPPH[•] puede reaccionar con toda la muestra, el tiempo de ensayo permite al radical reaccionar incluso con antioxidantes débiles y es utilizado para examinar antioxidantes hidrofóbicos (Floegel y col., 2011; Kedare y Singh, 2011). Sin embargo, es un método limitado, ya que el radical es muy sensible e interactúa con otros radicales, solventes y con el oxígeno. Por otro lado, es soluble en solventes orgánicos lo que muestra interferencia de absorbancia y puede ser un problema en el análisis cuantitativo (Kedare y Singh, 2011).

El uso del ensayo con el radical DPPH[•], depende en gran medida de la conformación estructural del antioxidante. Ha sido utilizado para evaluar la habilidad antioxidante de taninos, ácidos fenólicos, compuestos polifenólicos, catequinas, resveratrol, flavonoides, betalaínas, procianidinas, polisacáridos, antocianinas, y algunas otras sustancias encontradas en las plantas (Sánchez-Moreno, 2002).

El método de DPPH[•] es considerado como exacto, fácil y de bajo costo para evaluar la habilidad de los componentes al actuar como eliminadores de radicales libres, debido a que el compuesto radical es estable y no necesita ser generado. Además, los resultados

son altamente reproducibles y comparables con otros ensayos de radicales libres como el ABTS^{•+} (Kedare y Singh, 2011; Sánchez-Moreno, 2002).

1.4.3.2 Método ABTS^{•+}

El ensayo ABTS^{•+}, está basado en la inhibición de absorbancia por compuestos antioxidantes del catión radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS^{•+}). En este ensayo, la acción del antioxidante actúa a través de la eliminación del catión radical ABTS^{•+} (Sánchez-Moreno, 2002).

La técnica de decoloración de ABTS consiste en la pre-generación directa del radical ABTS^{•+} en su forma estable (azul/verde) usando persulfato de potasio (K₂S₂O₈). Cuando es obtenida una absorbancia equilibrada, el radical formado se reduce cuando se mezcla con el antioxidante y se calcula el porcentaje de inhibición de absorbancia a 734 nm como una función de la concentración de antioxidantes (Sánchez-Moreno, 2002).

La principal ventaja de este ensayo es que la generación del radical estable antes de agregar los antioxidantes, evita la interferencia de compuestos que afectan la formación del radical; dicha formación previene en el ensayo la sobrestimación de la capacidad antioxidante (Sánchez-Moreno, 2002).

Debido a que el catión radical ABTS^{•+} puede ser disuelto en medios acuosos y alcohólicos, este ensayo es capaz de probar la actividad antioxidante de sistemas hidrofílicos y lipofílicos (Floegel y col., 2011). Ha sido utilizado para evaluar la capacidad antioxidante de flavonoides polifenólicos, ácidos fenólicos, antocianinas, vitaminas lipofílicas, betalaínas, entre otros compuestos de plantas medicinales (Sánchez-Moreno, 2002).

Ambos radicales muestran la misma estequiometría con el TROLOX, utilizado como estándar: 2 mol de ABTS^{•+} o 2 mol del radical DPPH[•] son eliminados por 1 mol del análogo de Vitamina E hidrosoluble (Sánchez-Moreno, 2002).

La selección de un método para evaluar la actividad antioxidante depende del tipo de sustancia a evaluar (lipofílicas o hidrofílicas), de la composición del sistema, del tipo de sustrato oxidable, el método de inducción de la oxidación, y la forma de cuantificación, aspectos de suma importancia durante la prueba (Stratil y col., 2006).

1.5 MEDICIÓN DE COLOR

El color es una propiedad de la materia que se relaciona con el espectro de la luz y puede medirse físicamente en energía radiante o por la longitud de onda (Mathias-Retting y Ah-Hen, 2014).

El color se aprecia por el sentido de la vista al ser estimulada por la luz reflejada del objeto, el cual contiene sustancias con grupos cromóforos capaces de absorber parte de las radiaciones luminosas dentro de una determinada longitud de onda (Bello-Gutiérrez, 2000). De esta manera, el color es utilizado para determinar el contenido de pigmentos en un producto (Mathias-Retting y Ah-Hen, 2014).

Thomas Young (1802) propuso la *teoría tricromática*, en la que menciona que el ojo humano detecta diferentes colores debido a que contiene tres tipos de receptores, cada uno de ellos sensible a una única tonalidad del color. Esta teoría fue sugerida, ya que para los observadores humanos, cualquier color puede ser reproducido mezclando solo tres colores principales en cantidades variables (Badui-Dergal, 2006; Mathias-Retting y Ah-Hen, 2014).

El ojo humano puede distinguir aproximadamente 200 tonalidades diferentes, 20-25 grados de saturación y alrededor de 500 grados de luminosidad. Sin embargo, es sensible a un limitado rango de longitud de onda llamado espectro de luz visible, el cual constituye sólo una pequeña parte del espectro electromagnético que se extiende aproximadamente entre 380 y 780 nm (Mathias-Retting y Ah-Hen, 2014).

La medición de color puede ser realizada de forma visual (con el ojo humano), instrumental con un colorímetro, o bien utilizando la visión digital. Para fines técnicos se define el color en tres atributos (Wu y Sun, 2013):

- a) Matiz. Tono, tinte, color, “hue”, es caracterizado por la longitud de onda de la radiación y hace diferente un color de otro.
- b) Cromaticidad. Saturación, intensidad, pureza, “chroma”. Define la intensidad o pureza espectral del color que va de tonos grises, pálidos, apagados, a los más fuertes y vivos. Es el grado de color (incoloro, brillo, palidez).
- c) Luminosidad. Brillante, brillo, “brightness”. Es dado por el contenido total de energía. Da lugar a los colores claros y oscuros. Es el grado de oscuridad y el brillo máximo.

Existen diferentes escalas que se utilizan en instrumentos de medición del color, en el marco de una serie de condiciones iluminantes, observadores y la metodología de espectros. Entre ellos se encuentra el sistema Munsell, sistema CIE y sistema Hunter Lab (Mathias-Retting y Ah-Hen , 2014; Wu y Sun, 2013).

El sistema Hunter Lab, tiene una superficie uniforme de color definida por tres coordenadas rectangulares: L (luminosidad) donde 0 es el negro y 100 es el blanco; a (eje rojo-verde) donde los valores positivos son para rojo, negativos para verde y 0 el neutro; y b (eje amarillo-azul) valores positivos para amarillos, negativos para azul y 0 el neutro (Fig. 3) (Mathias-Retting y Ah-Hen , 2014).

Por tanto, a través de las técnicas de colorimetría es posible describir cualquier color con parámetros medibles y así determinar objetivamente las diferencias de color.

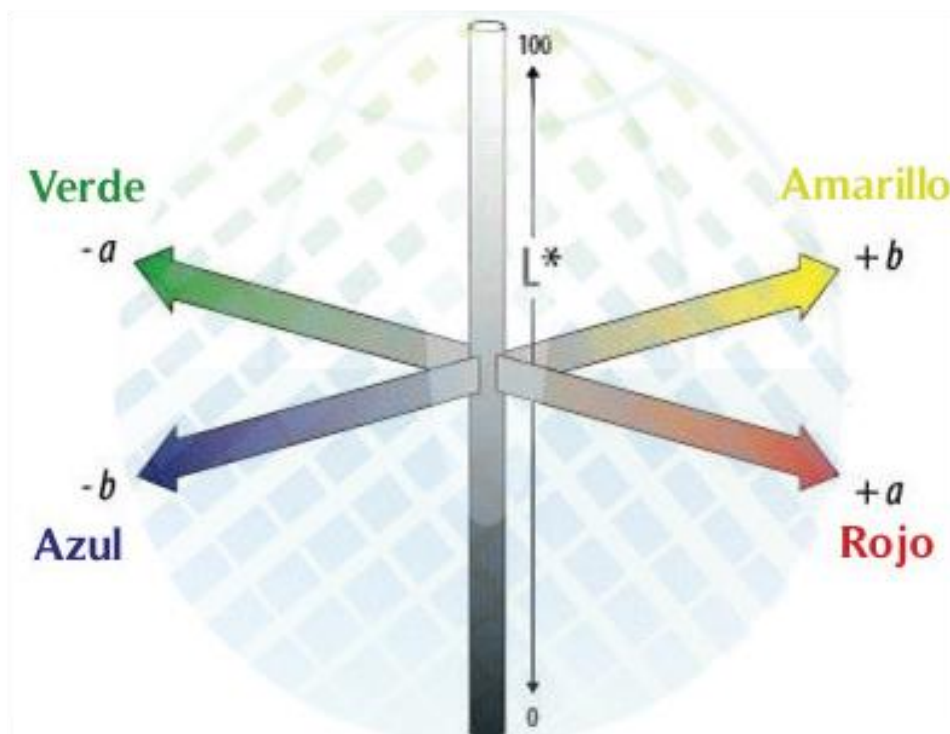


Figura 3. Coordenadas de color en el sistema Hunter Lab. Fuente: Mathias-Retting y Ah-Hen, (2014).

1.6 APLICACIÓN DEL PIGMENTO BIOACTIVO EN UN PRODUCTO ALIMENTICIO

Una de las principales aplicaciones de las antocianinas obtenidas de la col morada, es su uso como colorante natural en productos alimenticios con pH neutro o ligeramente ácido, de esta manera sustituyen a los colorantes sintéticos (McDougall y col., 2007).

Se ha reportado el uso de las antocianinas para colorear productos como bebidas o zumos, yogurt y en algunos casos en gelatinas. La gelatina, es un producto que puede ser encontrado en una amplia gama de colores y en un rango relativamente amplio de pH comparado con otros productos alimenticios, lo que la convierte en un producto idóneo para la aplicación de este pigmento con propiedades bioactivas.

1.6.1 Gelatina

La gelatina es un producto de proteína purificada obtenido del colágeno, proteína que se encuentra en los tejidos conectivos existentes en huesos, pieles y cueros de animales (incluyendo aves y pescados). La gelatina es una sustancia proteica clara y transparente soluble en agua que al enfriarse se gelifica y al calentarse se derrite (Adam-Mariod y Fadol-Adam, 2013; Choi y Regenstein, 2000).

Es un producto obtenido mediante hidrolisis parcial alcalina y/o hidrolisis ácida, hidrolisis enzimática o hidrolisis térmica, formando así cadenas proteicas que conforman la gelatina (Choi y Regenstein, 2000).

La gelatina es un polvo soluble en agua a $\sim 50^{\circ}\text{C}$, contiene proteínas (83-91%), sales, minerales y agua. Su composición aminoácida característica (Fig. 4), esta compuesta principalmente por glicina, prolina e hidroxiprolina. Además contiene cantidades específicas de 18 aminoácidos diferentes (9 de ellos aminoácidos esenciales) los cuales forman cadenas polipeptídicas de aproximadamente 1000 aminoácidos (Martínez-Tobias y col., 2011).

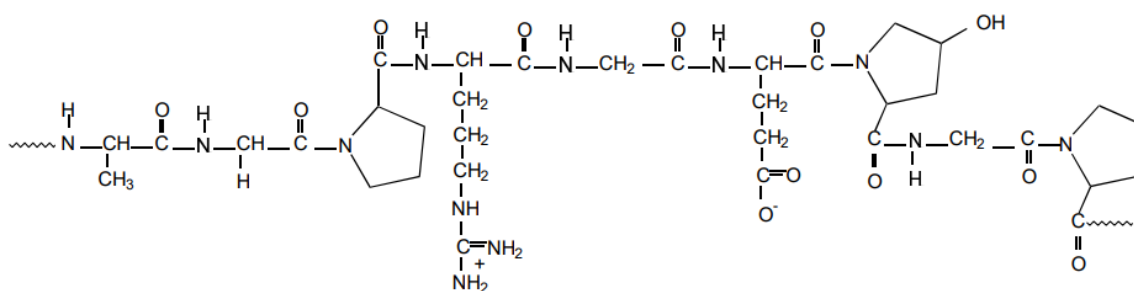


Figura 4. Secuencia aminoácida típica de la gelatina. Fuente: Eluk, (2006).

La gelatina es un polipéptido de alto peso molecular, y es un importante hidrocoloide que se usa en una amplia gama de productos alimenticios a partir de sus propiedades gelificantes y espesantes (Adam-Mariod y Fadol-Adam, 2013).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener pigmentos bioactivos a partir de col morada (*B. oleracea* var. *capitata*) y evaluar su aplicación en un producto alimenticio.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Probar diferentes condiciones de extracción de los pigmentos bioactivos.
- Caracterizar químicamente los extractos de col morada (fenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante por DPPH^{*} y ABTS⁺).
- Caracterizar el color de los extractos por colorimetría.
- Evaluar el efecto del pH en la tonalidad del extracto.
- Usar el pigmento obtenido para la elaboración de gelatina.
- Evaluar la estabilidad del pigmento en el producto obtenido.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS

Los extractos obtenidos a partir de col morada presentarán poder tintóreo y capacidad antioxidante, por lo que podrán denominarse como pigmentos bioactivos. Dichos pigmentos conservarán su propiedad antioxidante al ser adicionados en productos alimenticios.

CAPÍTULO 4

JUSTIFICACIÓN

En años recientes, la tendencia por el consumo de ingredientes más naturales ha incrementado, en relación con una mejora en la salud de los consumidores y a la búsqueda de un estilo de vida más saludable que mejore la calidad de vida de las personas. Por lo tanto, se están buscando fuentes naturales de colorantes como una alternativa a los colorantes sintéticos que se utilizan actualmente. Aunque ya se comercializan varios colorantes naturales, éstos no cubren la demanda del mercado, por lo que es necesaria la evaluación de otras fuentes de obtención de pigmentos naturales.

Las propiedades químicas que poseen las antocianinas de la col morada (*B. oleracea* var. *capitata*), le brindan características que la convierten en una opción viable a la sustitución de colorantes sintéticos, dado que sus pigmentos son capaces de presentar distintas tonalidades de coloración dependiendo del pH del medio en el que se encuentren.

Además de que las antocianinas presentan una alta estabilidad a factores ambientales como temperatura, luz, oxígeno y cambios de pH. Por las características que presentan, existe un elevado interés industrial en los pigmentos antociánicos extraídos de col morada, no obstante estos pigmentos solo han sido aplicados a pHs específicos con coloraciones rojas.

Estos pigmentos no sólo son capaces de brindar colores brillantes, sino que también poseen propiedades benéficas para la salud humana, debido a que presentan una alta actividad antiradical. Por ello, las antocianinas de la col morada son una prometedora fuente de pigmentos que podrían considerarse como bioactivos, ya que tienen un principal enfoque debido a su abundancia y aplicaciones como aditivos con valor agregado, convirtiendo así a los productos donde son adicionados en alimentos funcionales.

Con base en lo anterior, el análisis de la gama de tonalidades del pigmento bioactivo de col morada dependiendo del pH del medio, la caracterización de sus compuestos antioxidantes y su evaluación de la aplicación en un producto alimenticio resulta de gran interés, ya que de esta manera se lograría la adición de pigmentos antociánicos con propiedades antioxidantes en alimentos, buscando sustituir a los colorantes sintéticos.

La adición del pigmento en gelatina es una buena opción como primer acercamiento de la adición de pigmentos antociánicos en una matriz alimenticia, debido a que este producto se puede encontrar en una gran variedad de colores y en un rango relativamente amplio de pH.

CAPÍTULO 5

MATERIALES Y

MÉTODOS

5.1 MATERIALES

5.1.1 Material

Alcohol etílico absoluto (99.9%), metanol (99.9%), carbonato de sodio anhidro (99.6%) y ácido gálico (98.2%) fueron obtenidos de Fermont Reactivos y Equipo S.A de C.V. Cloruro de aluminio (99.0%) fue obtenido de Reasol MR. Acetato de sodio anhidro, cloruro de potasio, persulfato de potasio, ácido cítrico y carbonato de sodio fueron obtenidos de J.T. BAKER. El reactivo Folin-Ciocalteu 2N, quercetina (95%), 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) (98%), 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), (\pm)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (TROLOX) (97%) fueron obtenidos de Sigma Aldrich S. de R.L de C.V. Grenetina (275 grados bloom) marca D'Gari®. Para todas las pruebas se utilizó agua destilada.

5.1.2 Material vegetal

Las hojas de col morada (*Brassica oleracea* var. *capitata*), fueron adquiridas en un supermercado local de Toluca, Estado de México.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Procesamiento de la muestra

Las hojas de col morada (*B. oleracea* var. *capitata*) fueron lavadas y cortadas en fragmentos de 1 cm por 1 cm. Posteriormente, se ultracongelaron y se liofilizaron en un liofilizador FreeZone 1 Liter Benchtop Freeze Dry System LABCONCO. Después de la liofilización, las muestras obtenidas fueron trituradas en un molino eléctrico Gx4100 KRUPS hasta la obtención de un polvo fino. La muestra pulverizada se almacenó en frascos ámbar en un desecador, protegidos de la luz para su uso posterior.

5.2.2 Método de extracción

Los extractos fueron obtenidos usando un procesador ultrasónico UP200Ht Hielscher con una frecuencia de ~26 kHz. Se probaron dos tiempos de sonicación (10 y 20 min) y dos solventes diferentes (agua destilada y una solución etanol-agua 60:40). La temperatura fue controlada mediante baño de hielo.

En todos los casos, se disolvieron 0.5 g de la muestra pulverizada de *B. oleracea* var. *capitata* en 50 ml del solvente y posteriormente se sometieron a sonicación. Finalmente,

los extractos obtenidos se centrifugaron por 15 min, se decantaron y almacenaron en frascos ámbar a 4°C para su posterior uso.

5.2.3 Caracterización química de los extractos

5.2.3.1 Determinación de fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se utilizó el método Folin-Ciocalteu, siguiendo la metodología descrita por Ainsworth y Gillespie (2007) con ligeras modificaciones. Se utilizó una solución de carbonato de sodio anhídrido (Na_2CO_3) al 7% (p/v), reactivo Folin-Ciocalteu 1N y agua destilada. Cada una de las reacciones se homogeneizaron en vórtex, se dejaron reposar durante 40 minutos a temperatura ambiente en condiciones de obscuridad, finalmente se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS Thermo Fisher Scientific. Para la curva patrón se utilizó una solución de ácido gálico a distintas concentraciones (0.5 a 5 mg/mL), el resultado se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de muestra seca (Anexo 1).

5.2.3.2 Determinación de antocianinas

La cantidad de antocianinas totales contenidas en las muestras se cuantificaron a través del método de pH diferencial, siguiendo la metodología descrita por Chandrasekhar y col. (2012) y Martínez-Cruz y col. (2011) con ligeras modificaciones. Se utilizó un buffer de cloruro de potasio (KCl) 0.025 M con pH de 1.0 y un buffer de acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$) 0.4 M con pH de 4.5. Se tomaron 2 alícuotas del extracto a analizar, una alícuota se diluyó con el buffer pH 1.0 y la segunda se diluyó con el buffer pH 4.5, finalmente se realizó un barrido de 400 a 700 nm y se midió la absorbancia a 700 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS Thermo Fisher Scientific (Anexo 2).

5.2.3.3 Determinación de la capacidad antioxidante por ABTS^{•+}

Para la determinación de capacidad antioxidante se siguió la metodología descrita por López-Martínez y García-Galindo (2010) con algunas modificaciones. Se realizó una solución stock de ABTS^{•+} 7 mM y una solución de persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 140 mM. Se mezclaron 5 ml de la solución de ABTS^{•+} con 88 μL de solución $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (*solución A*). Esta solución se dejó reposar durante 12 horas a temperatura ambiente y en condiciones de obscuridad con la finalidad de formar el radical. Transcurrido el tiempo se diluyó la *solución A* con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.74 leída a 734 nm. Se tomaron 50 μL de la muestra, se añadieron 1500 μL de la solución de ABTS^{•+} diluida

y se agitaron con vórtex. Las reacciones se dejaron reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente en condiciones de obscuridad, posteriormente se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS Thermo Fisher Scientific. Para la curva patrón se utilizó una solución de TROLOX a distintas concentraciones (0.1 a 1 mM) (Anexo 3).

5.2.3.4 Determinación de capacidad antioxidante por DPPH•

La determinación de capacidad antioxidante en la muestra por el método DPPH• se realizó siguiendo la metodología descrita por Brand-Williams (1995) con ligeras modificaciones. Se tomaron 1950 µL de la solución de DPPH• (0.025 g/L) y se agregaron 50 µL de la muestra a analizar, para la curva patrón se utilizó una solución de TROLOX a distintas concentraciones (1.2 mM-0.006 µM). Se preparó un blanco utilizando 2000 µL de la solución de DPPH•. Cada una de las reacciones se agitaron con vórtex y se mantuvieron en reposo durante 40 minutos en condiciones de obscuridad a temperatura ambiente. Por último, se midió la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS Thermo Fisher Scientific (Anexo 4).

Asimismo, se determinaron las condiciones de extracción en las que se obtuvo una mayor cantidad de los compuestos de interés

5.2.4 Evaluación de color

La medición de color se realizó por medio de un colorímetro CR-400 KONICA MINOLTA. De cada muestra de extracto se determinó el valor de las variables L* (luminosidad), a* (de rojo a verde), b* (amarillo a azul).

5.2.5 Medición de pH

La medición del potencial de hidrogeno de cada muestra, se llevó a cabo mediante un potenciómetro HANNA pH 210 Microprocessor pH Meter, colocando el electrodo en cada muestra y tomando lectura del valor de pH.

Asimismo, se determinaron las condiciones de extracción en las que se obtuvo una mayor cantidad de los compuestos de interés.

5.2.6 Evaluación del efecto del pH en la tonalidad del extracto

Una vez elegidas las condiciones de extracción, se preparó nuevamente el extracto y se ajustó el pH del extracto con soluciones saturadas de $C_6H_8O_7$ y $NaHCO_3$ obteniendo distintas tonalidades del extracto dentro de los valores de pH en un rango de 2 a 12.

5.2.6.1 Barrido espectrofotométrico

Se realizó un barrido espectrofotométrico de cada uno de los tonos obtenidos (pH 2-12), con una longitud de onda inicial de 400 y una longitud de onda final de 800 nm con un intervalo de 1.0 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS Thermo Fisher Scientific.

5.2.6.2 Evaluación de color

La determinación de color para cada tonalidad obtenida se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en la sección 5.2.4.

5.2.7 Obtención del pigmento bioactivo

Se prepararon 150 mL de extracto con las condiciones elegidas, en una concentración de 1g/100 mL. Se seleccionó un tono para cada condición de pH, en condiciones ácidas se ajustó el pH a 3.5 (rosa), en condiciones neutras se ajustó el pH a 5.5 (violeta) y en condiciones alcalinas se ajustó el pH a 7.5 (azul). Para lo anterior, se utilizaron soluciones saturadas de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) y carbonato de sodio ($NaHCO_3$).

En cada una de las muestras se llevó a cabo un proceso de secado. Se evaporó el solvente utilizado mediante un rotaevapor, posteriormente las muestras fueron ultracongeladas y liofilizadas en un liofilizador FreeZone 1 Liter Benchtop Freeze Dry System LABCONCO. Después de la liofilización los pigmentos obtenidos fueron recuperados y almacenados en frascos ámbar dentro de un desecador para su posterior uso.

5.2.7.1 Rendimiento del pigmento

El rendimiento del pigmento, en peso seco, se calculó mediante la masa obtenida de cada pigmento, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Rendimiento = \left(\frac{\text{gramos del pigmento (PS)}}{\text{gramos iniciales de biomasa (PS)}} \right) * 100$$

5.2.7.2 Caracterización química del pigmento

5.2.7.2.1 Determinación de fenoles totales

La determinación de fenoles totales de los pigmentos se llevó a cabo mediante el método Folin-Ciocalteu siguiendo la metodología descrita en la sección 5.2.3.1.

5.2.7.2.2 Determinación de antocianinas

La cantidad de antocianinas totales en los pigmentos se cuantificó a través del método de pH diferencial siguiendo la metodología descrita en la sección 5.2.3.2.

5.2.7.2.3 Determinación de capacidad antioxidante por ABTS^{•+}

La determinación de capacidad antioxidante en los pigmentos por el método ABTS^{•+} se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección 5.2.3.3.

5.2.7.2.4 Determinación de capacidad antioxidante por DPPH[•]

La determinación de capacidad antioxidante en los pigmentos por el método DPPH[•] se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección 5.2.3.4.

5.2.8 Aplicación del pigmento bioactivo en un producto alimenticio

El pigmento obtenido fue aplicado en gelatina, en tres pHs para obtener tres colores (rosa, violeta y azul), empleando la siguiente metodología:

En 25 mL de agua se añadieron 1.75 g de grenetina y se dejó reposar durante 5 minutos, después se añadieron 25 mL de agua, se calentó con agitación constante hasta que se obtuvo una mezcla cristalina. Se agregaron 0.05 g de benzoato de sodio, posteriormente se agregó el pigmento en una concentración de 2 mg/mL.

Con la finalidad de ajustar el pH de la gelatina de acuerdo a cada pigmento, se agregó lo siguiente:

- Gelatina con pigmento rosa. Se adicionaron 0.1 g de ácido cítrico (C₆H₈O₇).
- Gelatina con pigmento violeta. Sin adición.
- Gelatina con pigmento azul. Se adicionaron 0.1 g de carbonato de sodio (NaHCO₃).

5.2.9 Determinación de estabilidad del color en gelatina

La estabilidad de color en la gelatina adicionada con el pigmento bioactivo se determinó evaluando el color en las muestras, de acuerdo con la metodología descrita en la sección 5.2.4, durante 21 días continuos de almacenamiento a 4°C.

5.2.10 Prueba hedónica de gelatina adicionada con el pigmento bioactivo

La evaluación de las características sensoriales de gelatinas adicionadas con el pigmento bioactivo se realizó a través de un análisis sensorial por un panel no entrenado de 20 personas. Se hizo una prueba hedónica, empleando escalas categorizadas de 1 a 9 puntos, donde los atributos a evaluar fueron: olor, color, sabor y textura. En la Figura 5 se presenta la valoración de cada puntuación en la escala hedónica. En esta prueba se analizaron las gelatinas adicionadas con el pigmento bioactivo, para el pigmento rosa se asignó el código N071, para el pigmento violeta se asignó el código N067 y para el pigmento azul se asignó el código N032.

Nombre: _____ Edad: _____
Fecha: _____

INSTRUCCIONES

Frente a usted se presentan seis muestras de gelatina saborizada. Por favor, observe cada una de ellas, yendo de izquierda a derecha. Indique el grado en que le gusta o disgusta cada atributo de cada muestra, de acuerdo al puntaje/categoría escribiendo el número correspondiente en la línea del código de la muestra.

Puntaje	Categoría
1	Me disgusta extremadamente
2	Me disgusta mucho
3	Me disgusta moderadamente
4	Me disgusta levemente
5	No me gusta ni me disgusta
6	Me gusta levemente
7	Me gusta moderadamente
8	Me gusta mucho
9	Me gusta extremadamente

Código	Calificación para cada atributo			
	Olor	Color	Sabor	Textura
N071				
N067				
N032				

Figura 5. Boleta de prueba hedónica de 9 puntos utilizada para evaluar atributos sensoriales en gelatinas adicionadas con pigmentos bioactivos.

5.2.11 Análisis estadístico

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresaron como el promedio de las tres determinaciones. Los resultados obtenidos fueron sometidos a una prueba de análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas entre medias, así como una prueba LSD para conocer la diferencia significativa entre tratamientos. Los análisis fueron procesados mediante el software Statgraphics Centurion XV versión 16.1.03.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS Y

DISCUSIÓN

6.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS

La caracterización química de los compuestos bioactivos encontrados en los extractos se llevó a cabo mediante técnicas espectrofotométricas para la determinación directa de fenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante.

6.1.1 Determinación de fenoles totales

En la Tabla 2 se presenta el contenido de fenoles totales (FT) determinado en los extractos obtenidos. Los extractos hidroalcohólicos con 10 y 20 min de sonicación mostraron la significativamente mayor cantidad de FT en mg EAG/g de muestra seca, 42.37 ± 0.40 y 43.00 ± 0.80 , respectivamente. Seguido del extracto acuoso con 10 min (40.49 ± 0.41) y por último el extracto acuoso por 20 min (34.85 ± 0.41).

Tabla 2. Contenido de fenoles totales y antocianinas en extractos de B. oleracea obtenidos bajo dos solventes y tiempos de sonicación

Solvente	Tiempo de sonicación (min)	Fenoles totales mg EAG/g	Antocianinas mg/g
H₂O	10	40.49 ± 0.41 ^b	5.81 ± 0.11 ^b
	20	34.85 ± 0.41 ^a	5.39 ± 0.07 ^a
Etanol:H₂O	10	42.37 ± 0.40 ^c	7.65 ± 0.09 ^d
	20	43.00 ± 0.80 ^c	7.31 ± 0.17 ^c

Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa con un nivel del 95% de confianza. Los datos son expresados como la media \pm desviación estándar, n=3.

En la Tabla 2, también puede observarse que los solventes utilizados tuvieron un efecto en la cantidad de compuestos extraídos. Se encontraron mejores resultados en la cantidad de FT al utilizar etanol-agua comparado con el uso de agua como solvente de extracción, el mismo efecto fue reportado por Lapornik y col. (2005), lo anterior puede deberse a que el etanol tiene una polaridad menor que el agua, lo que aumenta la eficiencia en la degradación de la pared celular (no polar) y facilita la liberación de estos compuestos.

Por otra parte, en los extractos en los que se utilizó etanol-agua como solvente, no hubo diferencia significativa en los tiempos probados (10 y 20 min), esto puede deberse a que la mayor cantidad de compuestos fueron extraídos durante los primeros minutos, Sun y

col. (2016) demostraron que un menor tiempo de extracción ultrasónica incrementa significativamente los niveles de compuestos fenólicos en los extractos. Por otro lado, en los extractos acuosos, sí se observó un efecto con respecto al tiempo de extracción, donde el menor tiempo de exposición ultrasónica mostró mayores resultados en el contenido de FT, lo anterior puede deberse a que un mayor tiempo de exposición a la sonicación posiblemente promueve la degradación de los compuestos fenólicos.

En los tratamientos de extracción evaluados en el presente trabajo, se encontró un mayor contenido de FT en los extractos de col morada que lo reportado por Leja y col. (2010), quienes encuentran 2.15-2.88 mg EAG/g de muestra fresca utilizando metanol como solvente de extracción. Uphadhyay y col. (2015) reportaron 2.26 mg EAG/g de muestra fresca en extractos obtenidos con metanol y mediante agitación. Los resultados de las condiciones de extracción probadas en este trabajo son ligeramente superiores a lo reportado por Kyoung-Chun y col. (2004) quienes encontraron 3.93 mg EAG/g de muestra fresca en extractos metanólicos.

Comparado con lo reportado en la literatura, se encontró que el uso de solventes orgánicos en combinación con la sonicación es más eficiente en la extracción de compuestos bioactivos. Mason y col. (1996) mencionan que el uso del ultrasonido en los procesos de extracción facilitan la ruptura de la pared celular liberando los pigmentos antocianínicos de las células. Otra razón puede ser que debido a que las ondas ultrasónicas producen un efecto de expansión y compresión de las moléculas en un sistema sólido-líquido causando un “efecto esponja”, el cual hace pasar el solvente a través de microcanales en la muestra promoviendo así la extracción de los compuestos (Cardoso de Oliveira y col., 2013; Mulet y col., 2003).

6.1.2 Determinación de antocianinas

Los resultados de la cuantificación de antocianinas en los extractos obtenidos se pueden observar en la Tabla 2. El extracto hidroalcohólico con 10 min de sonicación presentó la significativamente mayor cantidad de antocianinas (7.65 ± 0.09 mg/g de muestra seca), seguido del mismo extracto pero con 20 min (7.31 ± 0.17 mg/g de muestra seca), el extracto acuoso con 10 min (5.81 ± 0.11 mg/g de muestra seca) y finalmente el extracto acuoso con 20 min (5.39 ± 0.07 mg/g de muestra seca).

El solvente utilizado tuvo un efecto en la cantidad de antocianinas extraídas debido a la polaridad de éstos. El tiempo de extracción también mostró un efecto significativo en la

cantidad de los compuestos extraídos, observando una disminución de los mismos durante un tiempo de sonicación más prolongado. Lo anterior puede ser resultado de la degradación o descomposición de las antocianinas a otras estructuras fenólicas en un mayor tiempo de exposición a las ondas ultrasónicas por la acción mecánica de éstas sobre las moléculas de interés (Sun y col., 2016).

En un estudio de determinación de antocianinas, Wiczowski y col. (2013) reportaron 2.32 mg/g de muestra seca en extractos de col morada obtenidos mediante sonicación y utilizando como solvente de extracción una mezcla de metanol, agua y ácido trifluoroacético. Leja y col. (2010) reportaron una cantidad de antocianinas entre 0.66 y 1.05 mg/g de muestra fresca en extractos metanólicos de cuatro cultivos distintos de col morada. Mientras que McDougall y col. (2007) reportaron 1.37 mg/g de muestra fresca en extracciones de antocianinas de col morada con ácido acético. Como se muestra en la Tabla 2, los resultados encontrados en este estudio son mayores a los reportados previamente. Sin embargo, se encontró un menor contenido de antocianinas comparado con lo reportado por Ahmadiani y col. (2014), quienes muestran entre 11.11 y 17.80 mg/g de muestra seca con una extracción acetona/cloroformo.

Cabe mencionar que una de las ventajas más notables en los extractos obtenidos es que se encontró un mayor contenido de compuestos bioactivos con solventes aceptados para su uso en aplicaciones alimenticias. Finalmente, es importante destacar que la variación en el contenido de fenoles y principalmente de antocianinas en este vegetal puede estar influenciada por las condiciones de cultivo, la temporada de crecimiento, las condiciones climáticas, el origen geográfico, las prácticas agrícolas y los métodos analíticos utilizados (Kyoung-Chun y col., 2004).

6.1.3 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos fue determinada a través de los métodos DPPH[•] y ABTS^{•+}, los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Capacidad antioxidante por DPPH[•] y ABTS^{•+} en extractos de B. oleracea obtenidos bajo dos solventes y tiempos de sonicación.

Solvente	Tiempo de sonicación (min)	mmol TEAC/g	
		DPPH [•]	ABTS ^{•+}
H ₂ O	10	4.70 ± 0.03 ^c	9.44 ± 0.16 ^d
	20	5.53 ± 0.01 ^d	8.64 ± 0.15 ^b
Etanol:H ₂ O	10	4.31 ± 0.08 ^b	7.21 ± 0.05 ^a
	20	4.05 ± 0.04 ^a	8.99 ± 0.07 ^c

Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa con un nivel del 95% de confianza. Los datos son expresados como la media ± desviación estándar, n=3

Por el método DPPH[•], el extracto acuoso con 20 min de sonicación mostró la mayor capacidad antioxidante en mmol TEAC/g de muestra seca (5.53 ± 0.01), mientras que en el tratamiento hidroalcohólico con 20 min se observó la capacidad antioxidante más baja (4.05 ± 0.04).

En un estudio llevado a cabo por Mizgier y col. (2016) se reportó una concentración de 1.50 mmol TEAC/g de muestra fresca de col morada utilizando solventes orgánicos acidificados y un baño ultrasónico como método de extracción, mostrando una concentración menor comparada con los resultados obtenidos con las condiciones de extracción probadas. Wiczowski y col. (2015) reportaron resultados similares en la capacidad antioxidante por DPPH[•] obteniendo 4.7 mmol/g de muestra seca de col morada utilizando como solvente una mezcla de metanol, agua y ácido trifluoroacético con sonicación durante 30 segundos.

Con el método ABTS^{•+} se encontraron mayores resultados de capacidad antioxidante en todos los extractos comparado con los resultados obtenidos por el método DPPH[•]. Con esta técnica, el extracto acuoso con 10 min de sonicación tuvo la mayor capacidad antioxidante en mg TEAC/g de muestra seca (9.44 ± 0.16), seguido del tratamiento

hidroalcohólico con 20 min (8.99 ± 0.07), acuoso con 20 min (8.64 ± 0.15), mientras que en el tratamiento hidroalcohólico con 10 min (7.21 ± 0.05) se encontró la menor capacidad antioxidante.

En estudios anteriores donde se utilizó el radical ABTS^{•+} para determinar la capacidad antioxidante en *B. oleracea* var. *capitata*, se reportó un valor de 2.42-3.03 mmol TEAC/g de muestra fresca en una extracción con ácido cítrico (Pliszka y col., 2009), mientras que Mizgier y col. (2016) reportaron un valor de 2.53 mmol TEAC/g de muestra fresca en una extracción con baño ultrasónico y acetona adicionada con ácido acético, ambos estudios reportaron una capacidad antioxidante menor comparada con los extractos evaluados en este estudio.

Sadilova y col. (2007) reportan que las antocianinas contribuyen directamente a la capacidad antioxidante de este vegetal. Degenhardt y col. (2000) concluyeron que el valor de TEAC para las antocianinas de la col morada puede diferir por la sustitución de los ácidos orgánicos del pigmento. Las diferencias encontradas en la capacidad antioxidante de los extractos, puede no solo deberse a los tiempos probados (10 y 20 min), ni al solvente de extracción. Sino que de acuerdo con Sun y col. (2016) algunos productos de la degradación pueden tener incluso propiedades antioxidantes más fuertes que el precursor de antocianina, o bien las moléculas inestables encontradas podrían potenciar temporalmente la actividad antioxidante de los extractos.

Por otro lado, también se observó que el método ABTS^{•+} tuvo una actividad antirradical mayor en relación con el método DPPH[•]. Un efecto similar, fue descrito por Leja y col. (2010) quienes mencionan que las diferencias entre los resultados obtenidos por estos dos radicales puede deberse a la reacción de diferentes compuestos fenólicos con radicales libres de distintas estructuras químicas.

6.2 EVALUACIÓN DE COLOR DE LOS EXTRACTOS POR COLORIMETRÍA

Como parte de la caracterización del extracto, se llevó a cabo un análisis colorimétrico para conocer la tonalidad de cada extracto. La Tabla 4 muestra los resultados de la evaluación de color de los extractos obtenidos. En todos los tratamientos se determinaron los atributos de color: L*, a* y b*.

Tabla 4. Coordenadas cromáticas en los extractos de B. oleracea obtenidos bajo dos solventes y tiempos de sonicación.

Solvente	Tiempo de sonicación (min)	L*	a*	b*
H2O	10	33.88 ± 1.18 ^a	31.83 ± 2.46 ^b	-15.11 ± 1.09 ^a
	20	36.37 ± 0.76 ^b	33.16 ± 0.65 ^b	-14.63 ± 0.23 ^a
Etanol:H2O	10	50.44 ± 0.66 ^c	14.71 ± 1.15 ^a	-3.29 ± 0.32 ^b
	20	51.01 ± 1.75 ^c	16.12 ± 2.51 ^a	-4.57 ± 0.77 ^b

Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa con un nivel del 95% de confianza. Los datos son expresados como la media ± desviación estándar, n=3.

- Luminosidad (L*)

Los extractos hidroalcohólicos con 10 y 20 min de sonicación presentaron el valor significativamente más alto de luminosidad, 51.01 ± 1.75 y 50.44 ± 0.66, respectivamente, indicando que las muestras presentan mayor tendencia hacia el blanco, seguido del extracto acuoso con 20 min (36.37 ± 0.76) y el extracto acuoso con 10 min (33.88 ± 1.18) indicando que éstos últimos extractos son ligeramente más oscuros.

- Coordenada a*

En todos los extractos, los valores del *eje rojo-verde* (a*) fueron positivos, lo que indica la presencia de tonalidades rojas. El valor significativamente más alto de a* se encontró en los extractos acuosos con 10 min de sonicación (31.83 ± 2.46) y acuoso con 20 min de sonicación (33.16 ± 0.65). Mientras que los extractos hidroalcohólicos con 10 min (14.71 ± 1.15) y 20 min de sonicación (16.12 ± 2.51) mostraron el valor más bajo de a*. Los extractos acuosos tuvieron tonalidades más rojas comparados con los extractos en los que se utilizó etanol-agua.

- Coordenada b*

En todos los extractos, los valores del *eje amarillo-azul* (b*) fueron negativos indicando la presencia de tonalidades azules. Se encontró el valor significativamente más bajo de b* en los extractos acuosos con 10 min de sonicación (-15.11 ± 1.09) y con 20 min (-

14.63 ± 0.23). Los extractos hidroalcohólicos con 10 min y 20 min presentaron el valor más alto en b*, -3.29 ± 0.32 y -4.57 ± 0.77, respectivamente. Los extractos acuosos, bajo los dos tiempos de sonicación, mostraron tonalidades más azules comparados con los extractos hidroalcohólicos (con 10 y 20 min).

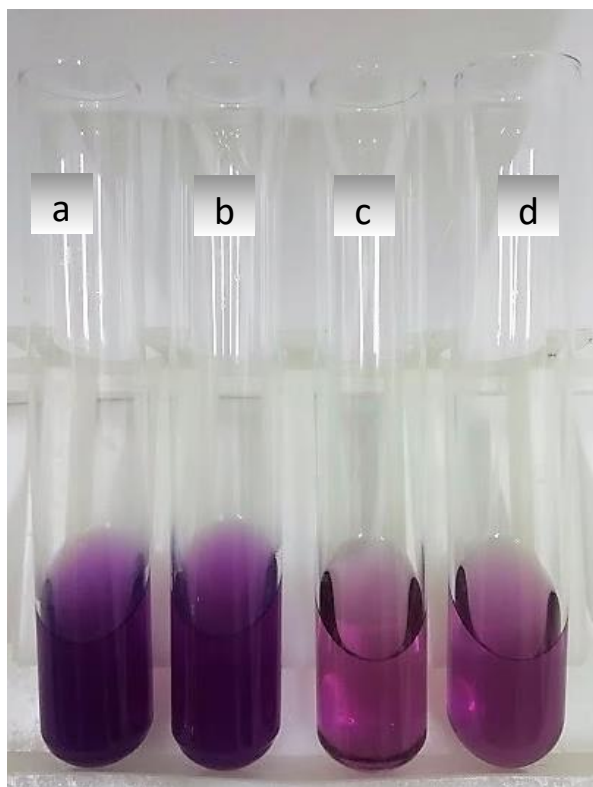


Figura 6. Extractos de B. oleracea bajo diferentes solventes y tiempos de sonicación. a y b) acuoso con 10 y 20 min; c y d) hidroalcohólico con 10 y 20 min.

Se observaron diferencias en la tonalidad de cada extracto (Fig. 6). Las diferencias de tonalidad encontradas entre los extractos obtenidos parecen deberse al tipo de solvente utilizado para cada tratamiento y no al tiempo de extracción de los compuestos.

6.3 MEDICIÓN DE pH DEL EXTRACTO

Se midió el pH de los extractos de col morada, los resultados se muestran en la Tabla 5. El extracto hidroalcohólico con 20 min de sonicación tuvo un pH de 6.57 ± 0.03 , seguido del extracto con 10 min (pH 6.38 ± 0.04), cercanos a la neutralidad. Mientras que los extractos acuosos con 10 min (pH 5.56 ± 0.03) y 20 min (pH 5.58 ± 0.04) presentaron valores más bajos de pH, con ligera acidez. De acuerdo con Valencia-Arredondo (2015), el pH es uno de los principales factores que hacen que las antocianinas de la col morada puedan mantener su color.

Tabla 5. pH de los extractos de B. oleracea bajo dos solventes y tiempos de sonicación.

Solvente	Tiempo de sonicación (min)	pH
H ₂ O	10	5.56 ± 0.03
	20	5.58 ± 0.04
Etanol: H ₂ O	10	6.38 ± 0.04
	20	6.57 ± 0.03

Con base en los resultados obtenidos de la caracterización química de los extractos, se observó que en los extractos hidroalcohólicos se obtuvo una mayor cantidad de los compuestos de interés, fenoles totales y antocianinas, que además presentan actividad antioxidante. Por lo tanto, se decidió utilizar el extracto hidroalcohólico con 10 min de sonicación para pruebas posteriores.

6.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL pH EN LA TONALIDAD DEL EXTRACTO

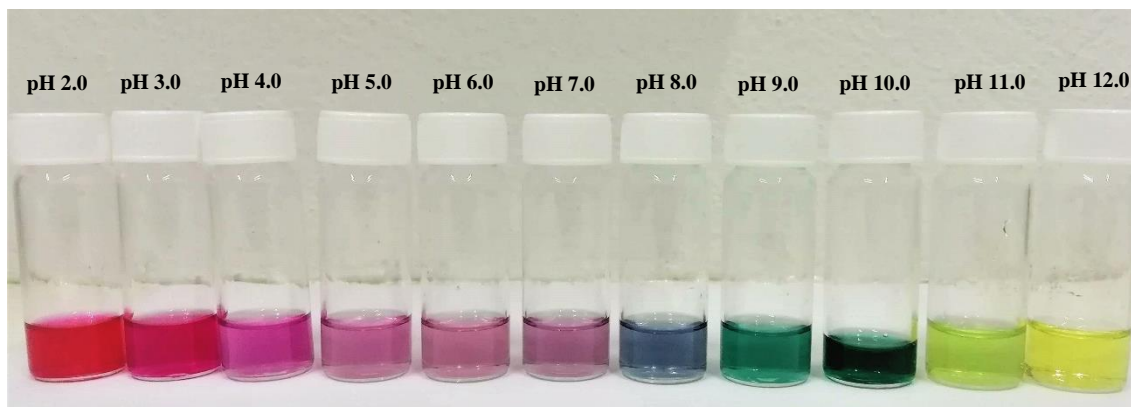
B. oleracea var. *capitata* ha sido considerada y utilizada como una buena fuente de color natural púrpura, sin embargo, las antocianinas de este vegetal además retienen gran variedad de colores en un amplio rango de pH (McDougall y col., 2007). Para conocer la gama de color que presentan las antocianinas extraídas de la col morada, se realizó un barrido de pH.

Como se muestra en la Figura 7, se observó el viraje de color conforme los valores de pH aumentaban o disminuían. A $\text{pH} \leq 2.0$ se presentó el color rojo, las antocianinas cambian a colores rosados en un pH entre 3.0 y 4.0, mientras que a pH entre 5.0 y 7.0 se presentan tonalidades violetas, alrededor de pH 8.0 el color cambia a azul, finalmente viran de verde a amarillo en medios alcalinos de 9.0 a 12.0. Lo anterior puede deberse a cambios batocrómicos de las antocianinas de la col conforme al aumento en el valor de pH, desde ácidos hasta alcalinos (Torkangerpoll y Andersen, 2005).

Los resultados concuerdan con lo descrito por Dyrby y col. (2001), quienes describen que las antocianinas de la col morada son de color rosa a pH 3.0, violeta a pH 5.0 y a pH 7.0

tienen coloración azul. Torkangerpoll y Andersen (2005) demostraron que derivados de cianidinas de la col morada mostraban diferentes tonalidades en los valores de pH entre 1.1 a 10.5.

Las antocianinas de la col morada son especialmente atractivas debido a que presentan color en un amplio rango de pH comparado con otros frutos como las grosellas negras, las cuales solo retienen color a $\text{pH} < 4.0$ (McDougall y col., 2007).



*Figura 7. Gama de colores de las antocianinas de *B. oleracea* a diferente pHs.*

6.4.1 Espectro de absorción en antocianinas de *B. oleracea*

Además, se realizó un espectro de absorción para las tonalidades presentadas por las antocianinas dependiendo del pH en el que se encontraban (Fig. 8). En pH entre 2.0-6.0, donde las tonalidades van desde rojos, rosados hasta violetas se obtuvo un pico de absorción máxima alrededor de 520-550 nm, el pico máximo de absorbancia decrecía conforme incrementaba el valor de pH y el pico máximo en esa misma longitud casi desapareció en el valor de pH 6.0 y 7.0.

En las antocianinas de coloración verde (pH 10.0) el pico máximo de absorción se encontró a 600 nm, en las antocianinas en pH 9.0 y 8.0 los picos de absorción máxima decrecieron en la misma longitud de onda con coloraciones verde y azul respectivamente. Finalmente, los picos más bajos de absorbancia se encontraron en condiciones alcalinas con coloraciones amarillas, en valores de pH de 11.0 y de pH 12.0 se encontró el pico con la absorbancia más baja una longitud de onda entre 600-650 nm.

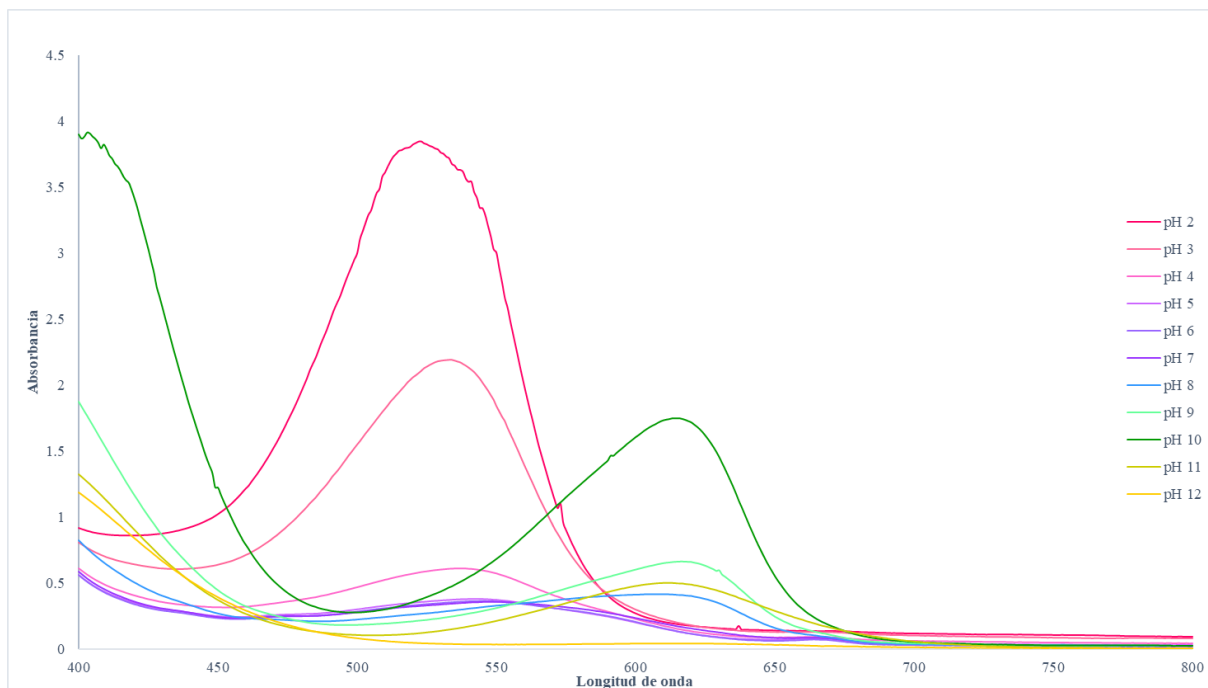


Figura 8. Espectro de absorción de antocianinas de *B. oleracea* en distintos pHs.

En un estudio realizado por Jin-Yuarn y col. (2008) concluyen que los resultados del espectro de absorción en extracto de col morada reflejan que los pigmentos incluyen compuestos fenólicos (280 nm), flavonoides (310-330 nm) y antocianinas (480-630 nm), estos resultados coinciden con el pico de absorción máximo de las antocianinas encontrado entre ~460-580 nm. De acuerdo con Takeda y col. (1994), las antocianinas exhiben tres picos característicos a 534, 569 y 620 nm en soluciones neutras y ligeramente ácidas. Por otro lado, un estudio realizado por Zhang y col. (2014), reportan resultados similares en un barrido espectrofotométrico de pigmentos naturales extraídos de flor de *Bauhinia blakeana* Dunn, las cuales viran de color rojo a verde en un rango de pH entre 2.2-9.0.

La principal diferencia entre las antocianinas *B. oleracea* var. *capitata* y las antocianinas derivadas de otras fuentes es el amplio rango de pH en que las primeras presentan coloración (Dyrby y col., 2001). De acuerdo con Valencia-Arredondo (2015) el pH repercute en la actividad molecular de las antocianinas de col morada, ya que estas moléculas experimentan transformaciones estructurales reversibles de acuerdo con la variación ácido-base. Los colores resultantes de esta prueba se encuentran en función de la estructura que tenga mayor proporción a determinado pH.

Otra posible explicación esta dada por McDougall y col. (2007), quienes describen que las antocianinas de este vegetal existen en equilibrio de cuatro especies moleculares. A

un pH bajo se forma el catión flavilo (rojo), y a medida que el pH incrementa se forma la base quinoidal (anhidra) de color azul, pasando por el carbinol incoloro y finalmente en condiciones alcalinas la pseudobase chalcona de color amarillo pálido comienza a dominar.

6.4.2 Evaluación de color

Se realizó una evaluación colorimétrica de las tonalidades del extracto de *B. oleracea*. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Para cada una de las muestras se determinaron los atributos de color L*, a* y b*.

Tabla 6. Coordenadas cromáticas en tonalidades de antocianinas de B. oleracea en distintos medios de pH.

pH	L*	a*	b*
2.0	71.58 ± 2.24 ^a	23.59 ± 5.45 ^d	-0.60 ± 0.14 ^b
3.0	75.04 ± 0.05 ^{ab}	31.07 ± 0.08 ^e	-4.72 ± 0.00 ^a
4.0	82.14 ± 0.03 ^{cde}	6.27 ± 0.30 ^c	-0.57 ± 0.04 ^b
5.0	85.80 ± 0.22 ^{ef}	5.12 ± 0.16 ^c	0.15 ± 0.00 ^b
6.0	81.83 ± 1.03 ^{cde}	1.26 ± 0.31 ^{bc}	0.61 ± 0.04 ^b
7.0	80.27 ± 0.28 ^{cd}	0.68 ± 0.28 ^{bc}	0.52 ± 0.07 ^b
8.0	79.88 ± 0.36 ^c	0.31 ± 0.05 ^{abc}	-1.51 ± 0.21 ^b
9.0	77.73 ± 0.04 ^{bc}	-2.36 ± 0.08 ^{ab}	-1.47 ± 0.04 ^b
10.0	82.98 ± 0.16 ^{cde}	-4.17 ± 1.53 ^a	-1.84 ± 0.86 ^a
11.0	83.12 ± 0.07 ^{df}	-1.87 ± 0.13 ^{ab}	4.06 ± 0.24 ^c
12.0	87.12 ± 0.87 ^f	-2.89 ± 0.53 ^{ab}	6.96 ± 1.37 ^d

Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa con un nivel del 95% de confianza. Los datos son expresados como la media ± desviación estándar, n=3.

- Luminosidad (L^*)

Se encontraron altos valores de luminosidad en todas las muestras, lo que indica muestras con alta tendencia hacia tonalidades blancas. La muestra de pH 2.0 de coloración roja fue la menos luminosa ($L^* = 71.58 \pm 2.24$), mientras que la muestra más luminosa fue la de pH 12.0 ($L^* = 87.12 \pm 0.87$). Entre las muestras con valores de luminosidad más altos se encuentran las de coloraciones rosas (pH 4.0), violetas (pH 5.0 y pH 6.0) y verde-amarillo (pH 11.0), mientras que las menos luminosas fueron las coloraciones rojas (pH 3.0), violeta-azul (pH 7.0), azules (pH 8.0) y verdes (pH 9.0 y 10.0).

- Coordenada a^*

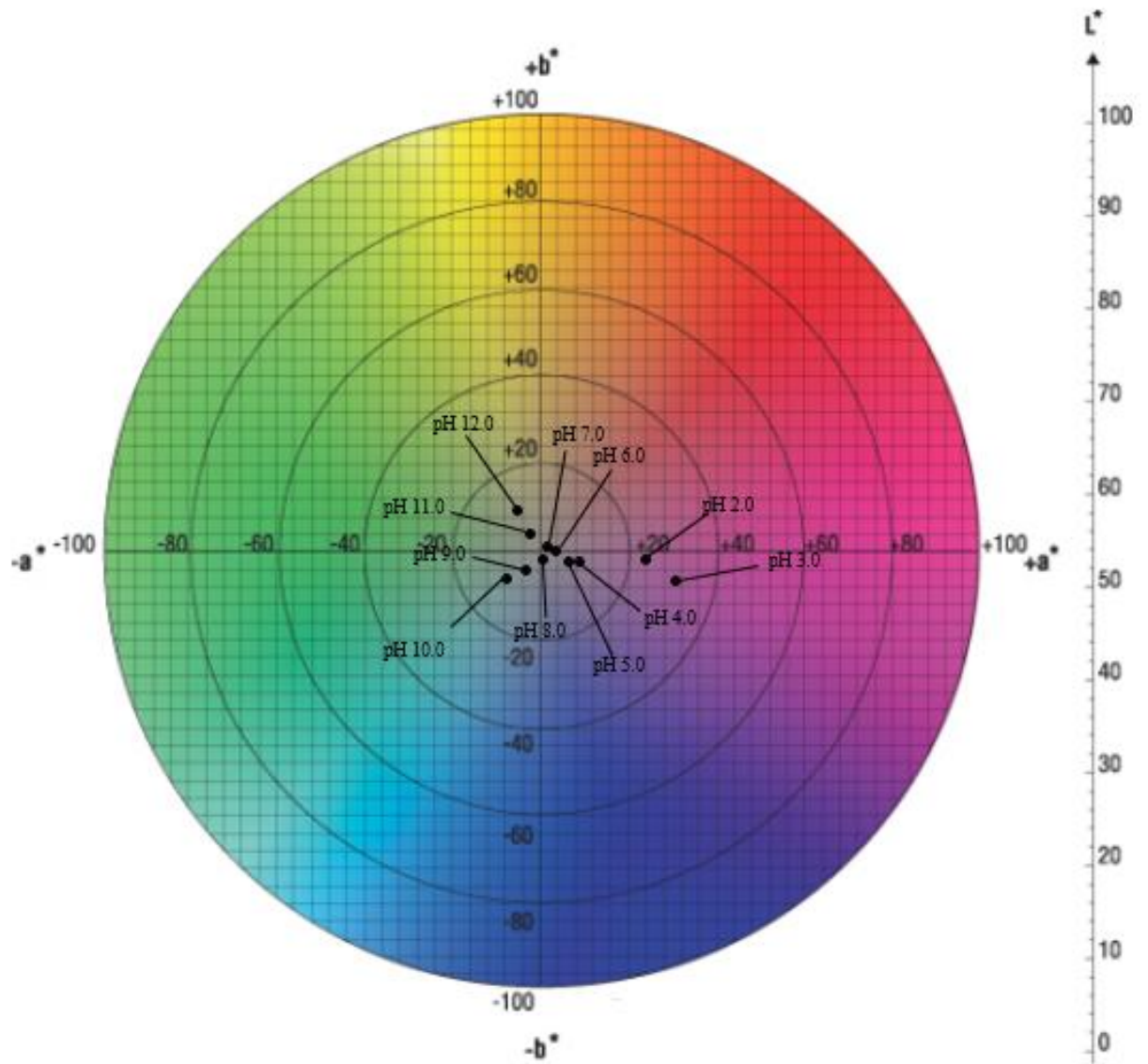
El valor de la coordenada a^* fue positivo para el rango de pH entre 2.0 y 8.0 lo que indica tonalidades rojas. La muestra de pH 3.0 tuvo tonalidades más rojas ($a^* = 31.07 \pm 0.08$), mientras que la muestra de pH 8.0 tuvo el valor más bajo casi cercano a la neutralidad ($a^* = 0.31 \pm 0.05$). En el rango de pH de 9.0 a 12.0 se encontraron valores negativos, indicando la presencia de tonalidades verdes. La muestra con pH 10.0 fue la más verde ($a^* = -4.17 \pm 1.53$), mientras que la muestra menos verde fue la de pH 11.0 (-1.87 ± 0.13). Los resultados de esta coordenada coinciden con lo observado en la Figura 7 y con el espectro de absorción (Fig. 8).

- Coordenada b^*

La coordenada b^* indica la presencia de tonalidades amarillas en las muestras de pH 5.0, 6.0, 7.0, 11.0 y 12.0 con valores positivos, siendo el valor de b^* más alto el de la muestra de pH 12.0 (6.96 ± 1.37) y el más bajo la muestra de pH 5.0 (0.15 ± 0.00). Los valores negativos de b^* en las muestras de pH 2.0, 3.0, 4.0, 8.0, 9.0 y 10.0 indicaron la presencia de tonalidades azules, siendo la muestra de pH 3.0 la más azul (-4.72 ± 0.00) y la muestra de pH 4.0 (-0.57 ± 0.04) la menos azul. Los resultados de esta coordenada coinciden con lo observado en la Figura 7 y con el espectro de absorción (Fig. 8).

Los valores de las tres coordenadas para todo el rango de pH donde las antocianinas muestran color, fueron graficados en el espacio CIELAB (Fig. 9). Cada uno de los diferentes tonos fueron encontrados en el diagrama de cromaticidad de acuerdo con lo observado a simple vista y en el espectro de absorción. Se encontraron colores que son cercanos al rojo, pasando por los tonos rosados, violetas, posteriormente azules, verdes y finalmente amarillos conforme al aumento en el valor de pH.

Con base en los resultados obtenidos en el espectro de absorción y en la evaluación de color en cada valor de pH, se decidió utilizar los pigmentos de color rosa, violeta y azul para adicionarlos en la matriz alimenticia.



*Figura 9. Diagrama de cromaticidad de espacio de color L*a*b* de las distintas tonalidades de las antocianinas de B. oleracea a diferentes valores de pH.*

6.5 PIGMENTO BIOACTIVO

6.5.1 Rendimiento del pigmento

Se prepararon 150 ml de extracto para cada color elegido usando una concentración de 1 g/100 mL, posteriormente se ajustó el pH de cada extracto de acuerdo con la tonalidad elegida (rosa, violeta, azul) y se liofilizaron. El rendimiento se calculó por diferencia de peso. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Rendimiento de extracción de los pigmentos de B. oleracea var. capitata.

Pigmento	Rendimiento (%)
Rosa (pH 3.5)	68.74 ± 0.37 ^b
Violeta (pH 5.5)	59.93 ± 0.46 ^a
Azul (pH 7.5)	60.31 ± 0.15 ^a

Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa con un nivel del 95% de confianza. Los datos son expresados como la media ± desviación estándar, n=3.

El mayor porcentaje de rendimiento se obtuvo en el pigmento rosa, mientras que el pigmento violeta y el pigmento azul, tuvieron el menor rendimiento. Bruno y col. (2012), obtuvieron un rendimiento de 8.9% en extractos de col morada utilizando agua acidificada y agitación constante como condiciones de extracción. En este estudio, se encontró que a través del uso de sonicación y un solvente hidroalcohólico, se obtiene hasta poco más de 7 veces mayor rendimiento respecto a lo reportado en la literatura.

6.5.2 Caracterización química del pigmento

Los pigmentos (rosa, violeta y azul) fueron caracterizados químicamente mediante técnicas espectrofotométricas para evaluar la presencia de compuestos bioactivos como fenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante por DPPH[•] y ABTS^{•+}.

6.5.2.1 Determinación de fenoles totales

En la Tabla 8 se muestra el contenido de FT encontrado en los pigmentos. El pigmento violeta tuvo la significativamente mayor cantidad de FT en mg EAG/g de muestra seca (42.48 ± 0.15), seguido del pigmento rosa (33.05 ± 0.40) y el pigmento azul (30.58 ± 0.50).

Tabla 8. Contenido de fenoles totales y antocianinas en pigmentos bioactivos de *B. oleracea*.

Pigmento	Fenoles totales mg EAG/g	Antocianinas mg/g
Rosa	33.05 ± 0.40 ^b	3.14 ± 0.02 ^b
Violeta	42.48 ± 0.15 ^c	7.15 ± 0.01 ^c
Azul	30.58 ± 0.50 ^a	2.16 ± 0.00 ^a

Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa con un nivel del 95% de confianza. Los datos son expresados como la media ± desviación estándar, n=3.

La cantidad de FT encontrados en el pigmento violeta no muestra diferencias con la cantidad de FT del extracto utilizado (hidroalcohólico con 10 min de sonicación), mientras que en los pigmentos rosa y azul se observa una disminución del 22% y del 27.83%, respectivamente, en el contenido de FT respecto al extracto hidroalcohólico. Esta diferencia, puede deberse a la modificación de las estructuras fenólicas ante cambios de pH. De acuerdo con Tovar-del Río (2013), el pH de las soluciones y la composición fenólica de la muestra puede interferir en la reacción llevada a cabo durante el ensayo para la determinación de FT. O bien, la pérdida observada puede ser por la degradación de los fenoles tras la exposición de la muestra a medios ácidos o alcalinos.

6.5.2.2 Determinación de antocianinas

Los resultados de la cantidad de antocianinas encontradas en los pigmentos se muestran en la Tabla 8. En el pigmento violeta se cuantificó la significativamente mayor cantidad de antocianinas (7.15 ± 0.01 mg/g de muestra seca), seguido del pigmento rosa (3.14 ± 0.02 mg/g de muestra seca), mientras que en el pigmento azul se encontró la menor cantidad de éstas (2.16 ± 0.00 mg/g de muestra seca).

Los pigmentos rosa y azul muestran un contenido menor de antocianinas respecto del extracto utilizado (hidroalcohólico con 10 min de sonicación), con una disminución del 58.96% y del 71.77% respectivamente, mientras que en el pigmento violeta se encontró una cantidad similar a la del extracto. La similitud en la cantidad de antocianinas entre el pigmento violeta y el extracto puede deberse a que a valores de pH entre 4 y 6 coexisten en equilibrio cuatro formas estructurales de las antocianinas (Castañeda-Ovando y col., 2009).

La disminución de la cantidad de antocianinas observada en los pigmentos rosa y azul, probablemente sea una consecuencia de la transformación estructural que sufren estos pigmentos con el cambio de pH. A pH 3 o menor, predomina la forma antociánica del catión flavilo y a pH entre 6 y 7 toman lugar las bases quinoidales, lo anterior se manifiesta por espectros de absorbancia diferentes (Torkangerpoll y Andersen, 2005). Esta disminución puede también ser producto de la degradación de las antocianinas en condiciones ácidas o alcalinas. Ekici y col. (2014), reportaron una pérdida de entre 26.09 y 51.94% de antocianinas extraídas de col morada cuando son sometidas a medios alcalinos (pH 7.0) y a medios ácidos (pH 3.0).

6.5.2.3 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los pigmentos fue determinada mediante los métodos DPPH[•] y ABTS^{•+}. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Capacidad antioxidante por DPPH[•] y ABTS^{•+} en pigmentos de B. oleracea.

Pigmento	mmol TEAC/g	
	DPPH[•]	ABTS^{•+}
Rosa	2.07 ± 0.03 ^b	1.66 ± 0.01 ^a
Violeta	4.15 ± 0.03 ^c	4.86 ± 0.05 ^c
Azul	1.95 ± 0.03 ^a	2.90 ± 0.07 ^b

Letras diferentes en columnas indican diferencia significativa con un nivel del 95% de confianza. Los datos son expresados como la media ± desviación estándar, n=3.

A través del método DPPH[•] se encontró que el pigmento violeta obtuvo la significativamente mayor capacidad antioxidante (4.15 ± 0.03 mmol TEAC/g de muestra seca), observando una pérdida de la capacidad en el pigmento rosa (2.07 ± 0.03 mmol TEAC/g de muestra seca) y el pigmento azul (1.95 ± 0.03 mmol TEAC/g de muestra seca). Se observó una disminución del 51.98% en el pigmento rosa y del 54.76% en el pigmento azul, en cuanto a la capacidad antioxidante de cada pigmento evaluado por este método. La actividad antioxidante de los pigmentos está relacionada con la cantidad de compuestos fenólicos cuantificados. Vera de Rosso y Mercadante (2007) reportaron que las antocianinas a pH alcalinos son más susceptibles a la degradación.

Mediante el método ABTS^{•+}, se observó la significativamente mayor capacidad antioxidante en mmol TEAC/g de muestra seca, en el pigmento violeta (4.86 ± 0.05), y una disminución de la capacidad en el pigmento azul (2.90 ± 0.07), mientras que en el pigmento rosa se observó la menor capacidad antioxidante (1.66 ± 0.01). El porcentaje de disminución en la capacidad antioxidante fue del 76.98% en el pigmento rosa y del 59.78% en el pigmento azul con este método. Las estructuras que se forman con el cambio de pH, o bien los productos de la degradación en el pigmento azul, podrían conferir una actividad antioxidante mayor cuando ésta es determinada mediante el radical ABTS^{•+} (Sun y col., 2016).

El pigmento violeta, mantuvo cantidades similares de compuestos bioactivos comparadas con el extracto hidroalcohólico, mientras que en los pigmentos rosa y azul se observó una disminución de los mismos. Lo anterior puede deberse al cambio en las formas estructurales de las antocianinas cuando son sometidas a medios ácidos o alcalinos, lo que podría modificar la absorbancia de las muestras. Sin embargo, los pigmentos mantienen una cantidad apreciable de antocianinas que proveen color y siguen presentando capacidad antioxidante, por lo que pueden considerarse pigmentos con propiedades bioactivas.

6.6 ESTABILIDAD DE COLOR EN GELATINA

Los pigmentos obtenidos (rosa, violeta y azul) fueron adicionados en una matriz alimenticia (gelatina natural sin colorantes). Se evaluó la estabilidad del pigmento en el tiempo mediante colorimetría. Para ello, se prepararon tres gelatinas a las cuales se les adicionó un pigmento diferente a cada una. Las gelatinas fueron almacenadas a 4°C y se les midió el color diariamente durante 21 días.

La Figura 10 muestra los resultados obtenidos en la coordenada L* que indica la luminosidad de la muestra. En los tres pigmentos evaluados se observó un incremento gradual del valor L* durante el periodo de almacenamiento. El valor más alto para L* al finalizar el tiempo de almacenamiento lo tuvo el pigmento violeta, seguido por el pigmento azul y el pigmento rosa. Una mayor luminosidad de las muestras indica una posible degradación del pigmento y una pérdida de color en las muestras a través del tiempo (Vera de Rosso y Mercadante , 2007).

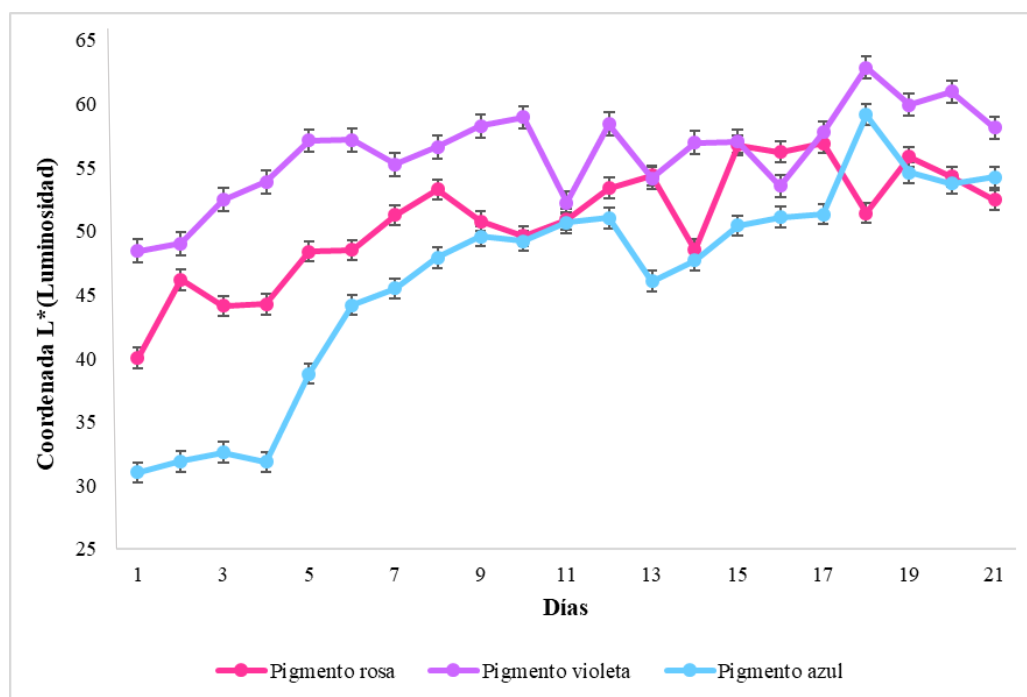


Figura 10. Cinética de la estabilidad de la coordenada L en los pigmentos bioactivos de B. oleracea.*

Los resultados de estabilidad en la coordenada a* (*eje rojo-verde*) se observan en la Figura 11. Los pigmentos rosa y violeta mostraron una alta estabilidad a través del tiempo de almacenamiento, los valores positivos de este valor indicaron la presencia de tonalidades rojas, que se mantuvieron constantes durante los 21 días de evaluación. Mientras que el pigmento azul fue el menos estable, mostrando valores negativos

indicando la presencia de ligeras tonalidades verdes que se incrementaron durante el tiempo de almacenamiento.

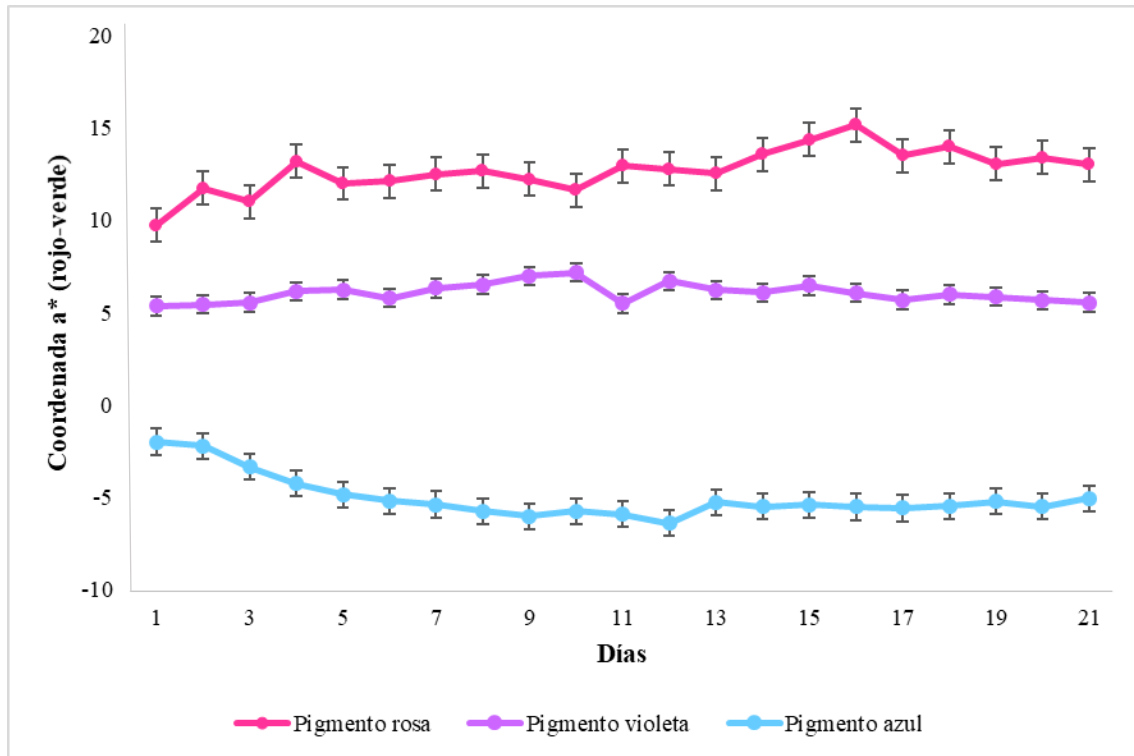


Figura 11. Cinética de estabilidad de la coordenada a de los pigmentos bioactivos de B. oleracea.*

La Figura 12 muestra los resultados de estabilidad obtenidos en la coordenada b* (*eje amarillo-azul*). Los pigmentos rosa y violeta mantuvieron el valor inicial durante el periodo de almacenamiento, ambas con ligeras tonalidades amarillas cercanas a la neutralidad. En el pigmento azul, se observó una degradación durante la evaluación de la coordenada b*, inicialmente se registraron valores negativos que indicaban la presencia de tonalidades azules, las cuales pasaron gradualmente a valores positivos indicando la presencia de tonalidades amarillas al finalizar el periodo de evaluación.

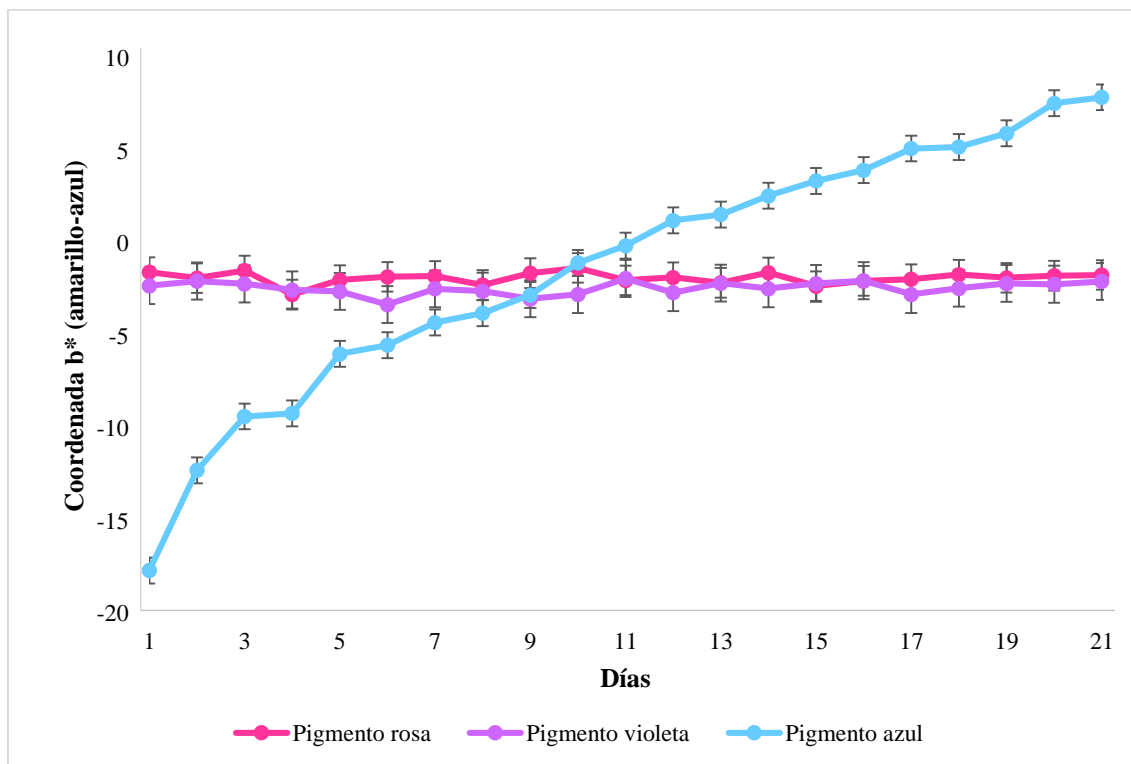


Figura 12. Cinética de la estabilidad de la coordenada b de los pigmentos bioactivos de B. oleracea.*

De acuerdo con los resultados obtenidos, durante el periodo de almacenamiento de la gelatina adicionada con los pigmentos bioactivos obtenidos de *B. oleracea* var. *capitata*, el pigmento azul es más susceptible de degradación, respecto a los otros pigmentos (rosa y violeta), los cuales mostraron una alta estabilidad y una baja degradación a través del tiempo.

Los resultados concuerdan con lo reportado en la literatura donde se menciona que las antocianinas presentan una alta estabilidad a $\text{pH} < 3.0$ y por encima de este valor se produce una mayor degradación del color, especialmente durante el calentamiento o el almacenamiento a temperaturas sin refrigeración (Walkowiak-Tomczak y Czapski, 2007). Por otro lado, Torkangerpoll y Andersen (2005) demostraron la alta estabilidad y mejor retención de color en valores bajos de pH (1.1-3.0) de derivados de cianidina extraídos de *B. oleracea*, pero observando un drástico cambio de color de los pigmentos en condiciones alcalinas durante el mismo periodo.

Las antocianinas extraídas de *B. oleracea* se caracterizan por tener una mejor estabilidad comparadas con las antocianinas de otros frutos o vegetales (Giusti y Wrolstad, 2003). Pliszka y col. (2009), así como Torkangerpoll y Andersen (2005) mencionan que la estabilidad del color de las antocianinas depende altamente del pH , argumentando que la

exposición a la luz podría disminuir la intensidad del color. Otros autores mencionan que los cambios de color de estos compuestos son más significativos en la región alcalina debido a su inestabilidad (Castañeda-Ovando, 2009).

La alta estabilidad y la retención de color encontrada en las antocianinas durante el periodo de almacenamiento, se debe también a la presencia de grupos acilo en el pigmento lo que dificulta la hidrólisis de la forma catiónica del flavilo rojo a la base incolora del carbinol (McDougall, y col., 2007). Sin embargo, la degradación del pigmento también depende de la temperatura de almacenamiento, la estructura dominante de las antocianinas y el método de extracción de las mismas (Pliszka y col., 2009).

Con base en los resultados encontrados, los colorantes antociánicos obtenidos de *B. oleracea* podrían ser usados como aditivos naturales estables en pH neutros y ligeramente ácidos para su aplicación en alimentos, lo cual puede ser una alternativa a los colorantes sintéticos utilizados actualmente en el procesamiento de alimentos.

6.7 PRUEBA HEDÓNICA DE GELATINA ADICIONADA CON PIGMENTOS BIOACTIVOS

Se formuló una gelatina adicionada con pigmentos bioactivos obtenidos a partir de hojas de *B. oleracea* (Fig. 13) y se realizó un análisis sensorial en el que se evaluaron cuatro atributos: olor, color, sabor y textura, con 20 panelistas no entrenados.



Figura 13. Gelatinas adicionadas con los pigmentos bioactivos de B. oleracea.

Los resultados del promedio de aceptación de los cuatro atributos evaluados para la gelatina adicionada con los pigmentos bioactivos se muestran en la Tabla 10 y la Figura 14. La muestra N071 alcanzó el puntaje más alto en los atributos de color (6.95 ± 1.43) y sabor (6.05 ± 1.73), mientras que la muestra N067 alcanzó los puntos más altos en los

atributos de textura (7.10 ± 1.71) y olor (6.10 ± 1.55). Finalmente, la muestra N032 tuvo las puntuaciones de evaluación más bajas en todos los atributos.

Tabla 10. Puntajes asignados a los atributos sensoriales en la prueba hedónica de gelatinas adicionadas con pigmentos bioactivos de B. oleracea.

Pigmento adicionado a la gelatina	Atributos			
	Olor	Color	Sabor	Textura
Rosa (N071)	5.55 ± 1.82	6.95 ± 1.43	6.05 ± 1.73	7.00 ± 1.92
Violeta (N067)	6.10 ± 1.55	5.95 ± 1.39	5.95 ± 1.96	7.10 ± 1.71
Azul (N032)	5.10 ± 1.33	4.65 ± 1.81	4.65 ± 1.95	6.65 ± 1.76

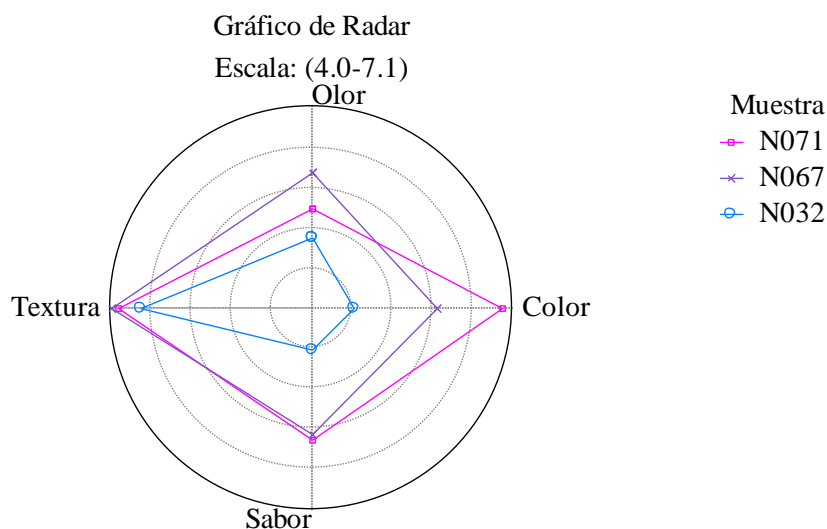


Figura 14. Perfil sensorial de la prueba hedónica en gelatinas adicionadas con pigmentos bioactivos.

Para evaluar la aceptación del producto, se tomó en cuenta la suma total de los cuatro atributos para los tres tratamientos evaluados (Figura 15). Se observó que la muestra N071 a la cual se le añadió el pigmento rosa tuvo el porcentaje más alto de aceptación (70.97%), seguido de la muestra N067, adicionada con el pigmento violeta, mientras que

la muestra N032 adicionada con el pigmento azul obtuvo los valores más bajos, la cual tuvo poca aceptación por los panelistas.

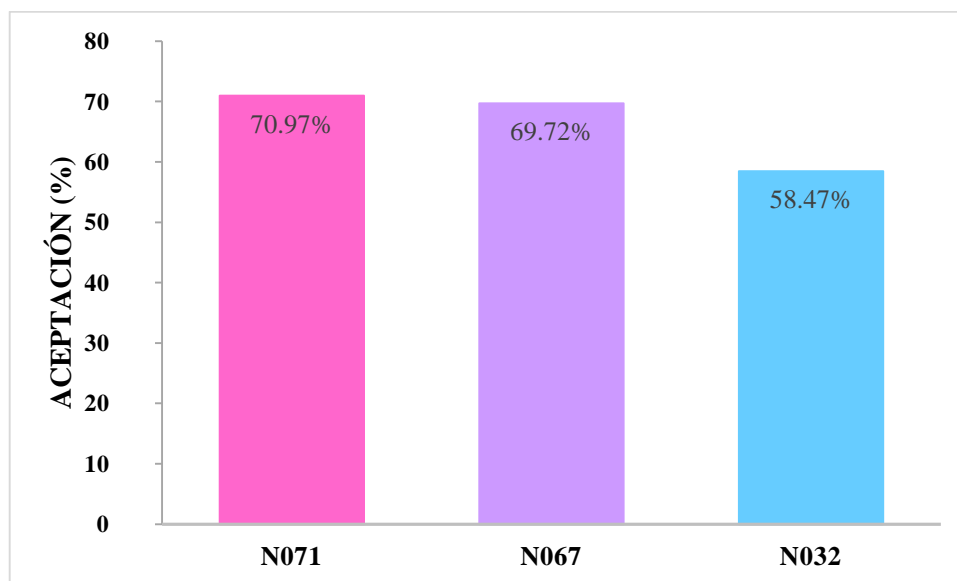


Figura 15. Aceptación de las gelatinas adicionadas con pigmentos bioactivos de B. oleracea. N071 rosa, N067 violeta y N032 azul.

En un estudio realizado por Effat y col. (2009) reportaron que la adición de color natural rojo de *B. oleracea* a altas concentraciones, 0.4 y 0.5%, en caramelos y gelatinas, afectó significativamente el color, sabor, olor y en general la aceptabilidad. También mencionan que la adición de color natural al 0.1% en gelatina, obtuvo una puntuación de 9.70 en una escala de 10, teniendo una buena aceptación por los panelistas. Sin embargo, los pigmentos antocianicos utilizados actualmente solo proveen coloraciones rojas, aunque la diversidad de tonalidades que puede ofrecer el pigmento obtenido de *B. oleracea*, como se demuestra en el presente trabajo, es más amplia.

Con base en el análisis sensorial de la gelatina formulada, los pigmentos con tonalidades rosas y violetas tienen una buena aceptación y podrían tener un alto potencial de aplicación. Por tanto, el pigmento obtenido a partir de col morada no solo podría conferir colores atractivos, sino que también puede conferir actividad antioxidante, lo que convertiría al alimento donde es adicionado en un alimento funcional.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

El solvente etanol-agua en combinación con el procesamiento ultrasónico permiten una mayor extracción de compuestos bioactivos en corto tiempo, y presentan actividad antioxidante independientemente del método de extracción utilizado.

El cambio de pH en las antocianinas extraídas de *B. oleracea* ocasiona el viraje de color mostrando diferentes tonalidades.

Se logró la obtención de pigmentos antociánicos de colores diferentes (rosa, violeta y azul) con propiedad antioxidante.

Los pigmentos rosa y violeta muestran una alta estabilidad de color a través del tiempo. Mientras que el pigmento azul presenta inestabilidad y como consecuencia modificación en el color.

La adición de los pigmentos rosa y violeta en gelatina presentan características sensoriales aceptables en color, sabor, olor y textura, lo que los convierte en pigmentos con potencial aplicación en este producto alimenticio.

Las antocianinas de *B. oleracea* son una buena alternativa a la sustitución de colorantes sintéticos, ya que proveen diferentes colores a partir de una sola fuente vegetal y además presentan actividad antioxidante.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS

- Probar diferentes concentraciones del pigmento bioactivo obtenido a partir de *B. oleracea* en gelatina.
- Evaluar la aplicación de los pigmentos bioactivos obtenidos a partir de *B. oleracea* en otros alimentos.
- Realizar estudios para la protección y estabilización de color de los pigmentos bioactivos obtenidos de *B. oleracea* y así potenciar su aplicación.
- Determinar otras propiedades bioactivas y su estabilidad, así como otras tonalidades del pigmento y su posible aplicación en alimentos.

CAPÍTULO 9

REFERENCIAS

- Adam-Mariod, A., y Fadol-Adam, H. (2013). Review: Gelatin, source, extraction and industrial applications. *ACTA Sci. Pol., Technol. Aliment*, 12(2), 135-147.
- Ahmadiani, N., Robbins, R., Collins, T., y Giusti, M. (2014). Anthocyanins contents, profiles, and color characteristics of red cabbage extracts from different cultivars and maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 7524-7531.
- Ainsworth, E. A., y Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875-877.
- Astrid-Garzón, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Acta Biológica colombiana*, 13(3), 27-36.
- Attoe, E., y Von Elbe, J. (1981). Photochemical degradation of betanine and select anthocyanins. *Journal of Food Science*, 46(6), 1934-1937.
- Badui-Dergal, S. (2006). Química de los alimentos. En I. Guerrero-Legarreta, E. López-Hernández, y R. Armenta-López, *Pigmentos* (Cuarta Edición ed., págs. 401-438). Ciudad de México, México: Pearson.
- Bakowska-Barczak, A. (2005). Acylated anthocyanins as stable, natural food colorants- A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 14/55(2), 107-116.
- Bello-Gutiérrez, J. (2000). *Ciencia bromatológica: Principios generales de los alimentos*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos S.A.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., y Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bridle, P., y Timberlake, C. (1997). Anthocyanins as natural food colours- selected aspects. *Food Chemistry*, 58(1-2), 103-109.
- Bruno, E., Campañone, L., y Martino, M. (2012). Some functional properties of pigment extracts from red cabbage (*Brassica oleracea*) and redbeet (*Beta vulgaris*). *Latin American Applied Research*, 42, 427-432.

- Cardoso de Oliveira, R., Davantel de Barros, S., y Luiz-Gimenes , M. (2013). The extraction of passion fruit oil with green solvents. *Journal of Food Engineering*, *117*, 458-263.
- Cartea, M., Francisco, M., Soengas, P., y Velasco, P. (2011). Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. *Molecules*, *16*, 251-280.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M., Rodríguez, J., y Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, *113*, 859-871.
- Castañeda-Sánchez, A., y Guerrero-Beltrán, J. (2015). Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, *9*, 25-33.
- Chandrasekhar, J., Madhusudhan, M. C., y Raghavarao, K. M. (2012). Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. *Food and bioproducts processing*, *90*, 615-623.
- Chengaiyah, B., Mallikarjuna-Rao, K., Mahesh-Kumar, K., Alagusundaram, M., y Madhusudhana-Chetty, C. (2010). Medicinal importance of natural dyes- A review. *International Journal of PharmTehc Research*, *2*(1), 144-145.
- Choi, S., y Regenstein, J. (2000). Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatine. *Food Chemistry and Toxicology* .
- Degenhardt, A., Knapp, H., y Winterhalter, P. (2000). Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *Food Chemistry*, *48*, 338-343.
- Draghici, G., Lupu, M., Borozan, A.-B., Nica, D., Alda, S., Alda, L., Bordean-Despina, M. (2013). Red cabbage, millennium's functional food. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, *17*(4), 52-55.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., y Mérillon, J.-M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 1768-1774.
- Dyrby, M., Westergaard, N., y Stapelfeldt, H. (2001). Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chemistry*, *72*, 431-437.

- Effat, M., Azouz and Lobna, A., y Hareedy, A. (2009). Evaluation of red cabbage anthocyanins pigments and its potential uses as antioxidant and natural food colorants. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, 17(2), 361-372.
- Ekici, L., Simsek, Z., Ozturk, I., Sagdic, O., y Yetim, H. (2014). Effects of temperature, time, and pH on the stability of anthocyanin extracts: Prediction of total anthocyanin content using nonlinear models. *Food Analytical Methods*, 7(6), 1328-1336.
- Eluk, D. (2006). *Modelado reocinético de la maduración de soluciones de gelatina en flujo de corte* (Tesis de maestría). Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química Universidad Nacional del Litoral. Argentina, Santa Fé.
- Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Koo, S., y Chun, O. (2011). Comparision of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 1043-1048.
- Galanakis, C. (2017). *Handbook of grape processing by-products*. Vienna, Austria: Academic Press.
- Galván, C., Guisado-Barrilao, R., García , M., Ochoa , J., y Ocaña-Wilhelmi, J. (2008). Antioxidantes y ejercicio físico: funciones de la melatonina. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*, 1(2), 61-72.
- Giusti, M., y Wrolstad, R. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems: A review. *Biochemical Engineering Journal*, 14, 217-225.
- Gonzales, G., Raes, K., Vanhoutte, H., Coelus, S., Smagghe, G., y Van-Camp, J. (2015). Liquid chromatography-mass spectrometry coupled with multivariate analysis for the characterization and discrimination of extractable and nonextractable polyphenols and glucosinolates from red cabbage and Brussels sprout waste streams. *Journal of Chromatography. A.*, 10(1402), 60-70.
- Gürses, A., Acikyildiz, M., Günes, K., y Gürses, M. (2016). Dyes and pigments. En *SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability*. Springer.
- He, J., y Giusti, M. (2010). Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 163-187.

- Hock Eng, K., Azrina, A., Sou Teng, T., y See Meng, L. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food and Nutrition Research*, 61.
- Hurrell, J., Ulibarri, E., Delucchi, G., y Pochettino, M. (2009). Hortalizas: Verduras y legumbres. En *Repollo* (págs. 144-145). Buenos Aires, Argentina : LOLA.
- Jackman, R., y Yada, R. (1987). Anthocyanins as food colorants- A review. *Journal of Food Biochemistry*, 11, 201-247.
- Jin-Yuarn, L., Chia-Yuan, L., y I-Farn, H. (2008). Characterisation of pigment components in red cabbage (*Brassica oleracea* L. var.) juice and their anti-inflammatory effects on LPS-stimulated murine splenocytes. *Food Chemistry*, 109, 771-781.
- Kedare, S., y Singh, R. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412-422.
- Konczak, I., y Zhang, W. (2004). Anthocyanins- More than nature's colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 239-240.
- Kyoung-Chun, O., Smith, N., Sakagawa, A., y Young-Lee, C. (2004). Antioxidant properties of raw and processed cabbages. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55(3), 191-199.
- Lakshmi, C. (2014). Food Coloring: The Natural Way. *Journal of Chemical Sciences*, 4(2), 87-96.
- Lapornik, B., Prosek, M., y Golc-Wondra, A. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214-222.
- Leja, M., Kaminska, I., y Kolton, A. (2010). Phenolic compounds as the major antioxidants in red cabbage. *Folia Horticulture*, 22(1), 19-24.
- López-Martínez, L. X., y García-Galindo, H. S. (2010). Actividad antioxidante de extractos metanólicos y acuosos de distintas variedades de maíz mexicano. *Nova Scientia*, 2(3).

- Markakis, P., y Jurd, L. (1974). Anthocyanins and their stability in foods. *Critical Reviews in Food Technology*, 4(4), 437-456.
- Martínez-Cruz, N., Arévalo-Niño, K., Verde-Star, M. J., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A., Núñez-González, M. A., y Morales-Rubio, M. E. (2011). Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl (zarzamora). *Comunicación técnica*, 42 (4).
- Martínez-Tobias, G., Uresti-Marin, R., Ramírez- De León, J., y Velazquez- De La Cruz, G. (2011). Extracción y caracterización de algunas propiedades fisicoquímicas de la gelatina de piel de trucha. *Ciencia@UAQ*, 4(2), 26-34.
- Mason, T., Paniwnyk, L., y Lorimer, J. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3, 253-260.
- Mathias-Retting, K., y Ah-Hen, K. (2014). El color en los alimentos un criterio de calidad medible. *Agro Sur*, 42(2), X-X.
- McDougall, G., Stewart, F., Dobson, P., y Stewart, D. (2007). Anthocyanins from red cabbage- stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 68, 1285-1294.
- Mizgier, P., Kucharska, A., Sokol-Letowska, A., Kolniak-Ostek, J., Kidon, M., y Fecka, I. (2016). Characterization of phenolic compounds and antioxidant and anti-inflammatory properties of red cabbage and purple carrot extracts. *Journal of Functional Foods*, 21, 133-146.
- Mulet, A., Cárcel, J., y Bon, S. (2003). New food drying technologies- use of ultrasound. *Food Science and Technology International*, 9(3), 215-220.
- Patras, A., P.Brunton, N., O'Donnell, C., y Tiwari, B. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Food Science & Technology*, 21, 3-11.
- Pekal, A., y Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction of Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, 7, 1776-1782.
- Pliszka, B., Huszcza-Ciolkowska, G., Mielezsko, E., y Czaplicki, S. (2009). Stability and antioxidative properties of acylated anthocyanins in three cultivars of red cabbage

- (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.f. *rubra*). *Journal of Science of Food and Agriculture* (89), 1154-1158.
- Podsedek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT*, 40, 1-11.
- Porrás-Loaiza, A., y López-Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 121-134.
- Quintanar-Escorza, M., y Calderón-Salinas, J. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, 28(3), 89-101.
- Sadilova, E., Carle, R., y Stintzing, F. (2007). Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(12), 1461-1471.
- Sánchez-Juan, R. (2013). La química del color en los alimentos. *Química Viva*, 12(3), 234-246.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*, 8, 121-137.
- Sapers, G., Taffer, I., y Ross, L. (1981). Functional properties of a food colorant prepared from Red Cabbage. *Journal of Food Science*, 46(1), 105-109.
- Shahidi, F., Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757-781
- Shamina, A., Shiva, K., y Parthasarathy, V. (2007). Food colours of plant origin. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 2(087).
- Sigurdson, G., Tang, P., y Giusti, M. (2017). Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, 1-20.
- Siva, R. (2007). Status on natural dyes and dye-yielding plants in India. *Current science*, 92(7).

- Spagna, G., Barbagallo, R., Todaro, A., Duarte, M., y Pifferi, P. (2003). A method for anthocyanin extraction from fresh grape skin. *Italian Journal of Food Safety*, 3(15), 337-346.
- Stratil, P., Klejdus, B., y Kubán, V. (2006). Determination of Total Content of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Vegetables-Evaluation of Spectrophotometric Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 607-616.
- Sun, J., Mei, Z., Tang, Y., Ding, L., Jiang, G., Zhang, C., Bai, W. (2016). Stability, antioxidants capacity and degradation kinetics of Pelargonidin-3-glucoside exposed to ultrasound power at low temperature. *Molecules*, 21(1109).
- Takeda, K., Yanagisawa, M., Kifune, T., Kinoshita, T., y Timberlake, C. (1994). A blue pigment complex in flowers of *Salvia patens*. *Phytochemistry*, 35, 1167-1169.
- Timberlake, C. (1980). Anthocyanins- occurrence, extraction and chemistry. *Food Chemistry*, 5, 69-80.
- Torkangerpoll, K., y Andersen, O. (2005). Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry*, 89, 427-440.
- Tovar-del Río, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera* (Tesis de grado). Facultad de Tecnología, Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia, Pereira.
- Uphadhyay, R., Sehwal, S., y Singh, S. (2015). Antioxidant activity and polyphenol content of Brassica oleracea varieties. *International Journal of Vegetable Science*, 22(4), 253-263.
- Valencia-Arredondo, J.A. (2015). *Sistema de un diseño electroforético en flujo libre para purificar antocianinas de col morada (Brassica oleracea)* (Tesis de maestría). Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- Venereo-Gutiérrez, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133.

- Vera- de Rosso, V., y Mercadante, A. (2007). Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 347-352.
- Volden, J., Borge, G., Bengtsson, G., Hansen , M., Thygesen, I., y Wicklund, T. (2008). Effect of thermal treatment on glucosinolates and antioxidant-related parameters in red cabbage (*Brassica oleracea* L. ssp. capitata f. rubra). *Food Chemistry*, 109, 595-605.
- Walkowiak-Tomczak, D., y Czapski, J. (2007). Colour changes of a preparation from red cabbage during storage in a model system. *Food Chemistry*, 104, 709-714.
- WCSP. (16 de agosto de 2018). *Plants of the world online*. Obtenido de <http://apps.kew.org/wcsp/>
- Wiczowski, W., Szawara-Nowak, D., y Topolska, J. (2013). Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity. *Food Research International*, 51, 303-309.
- Wiczowski, W., Szawara-Nowak, D., y Topolska, J. (2015). Changes in the content and composition of anthocyanins in red cabbage and its antioxidant capacity during fermentation, storage and stewing. *Food Chemistry*, 167, 115-123.
- Wu, D., y Sun, D.-W. (2013). Colour measurements by computer vision for food quality control - A review. *Trends in Food Science & Technology*, 29, 5-20.
- Xu, F., Zheng, Y., Yang, Z., Cao, S., Shao, X., y Wang, H. (2014). Domestic cooking methods affect the nutritional quality of red cabbage. *Food Chemistry*, 161, 162-167.
- Yasuf, M., Shabbir, M., y Mohammad, F. (2017). Natural Colorants: Historical, Processing and Sustainable Prospects. *Natural Products and Bioprospecting*.

CAPÍTULO 10

ANEXOS

Anexo 1. Determinación de fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se prepararon las siguientes soluciones:

- A) Solución de carbonato de sodio anhidrido (Na_2CO_3) 7% (p/v). Se disolvieron 3.5 g de carbonato de sodio anhidrido en 25 mL de agua destilada, se aforó a 50 mL con agua destilada.
- B) Solución stock de ácido gálico 0.1 mg/mL. Se pesaron 0.001 g de ácido gálico y se aforó a 10 mL con agua destilada.

La curva patrón se preparó de acuerdo con la siguiente tabla.

Tabla 11. Preparación de la curva patrón de fenoles totales.

Ácido gálico (mg/mL)	Ácido gálico (μL)	Folin-Ciocalteu (μL)	Na_2CO_3 (μL)	Agua destilada (μL)
0	0			1000
0.5	10			990
1.0	20			980
1.5	30			970
2.0	40	250	750	960
2.5	50			950
3.0	60			940
3.5	70			930
4.0	80			920
4.5	90			910
5.0	100			900

Se adicionó en un tubo de ensayo la solución de ácido gálico o de la muestra a analizar, se agregó el reactivo Folin-Ciocalteu 1N y se agitó vigorosamente con vórtex. Posteriormente, se agregó la solución de Na_2CO_3 al 7% y enseguida el agua destilada, se homogeneizó y agitó suavemente. Las preparaciones se dejaron reposar durante 40 minutos a temperatura ambiente en condiciones de obscuridad. Finalmente se leyó la absorbancia a 760 nm. La cantidad de fenoles totales se determinó con base en la siguiente ecuación:

$$\text{Ácido gálico} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \left(\frac{D \cdot O + b}{m} \right) * FD$$

Donde

D.O: absorbancia de la muestra a 760 nm

b: ordenada al origen

m: pendiente de la curva patrón

FD: factor de dilución

El resultado se expresó como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) /mL de extracto.

La curva patrón se muestra en la Figura 16.

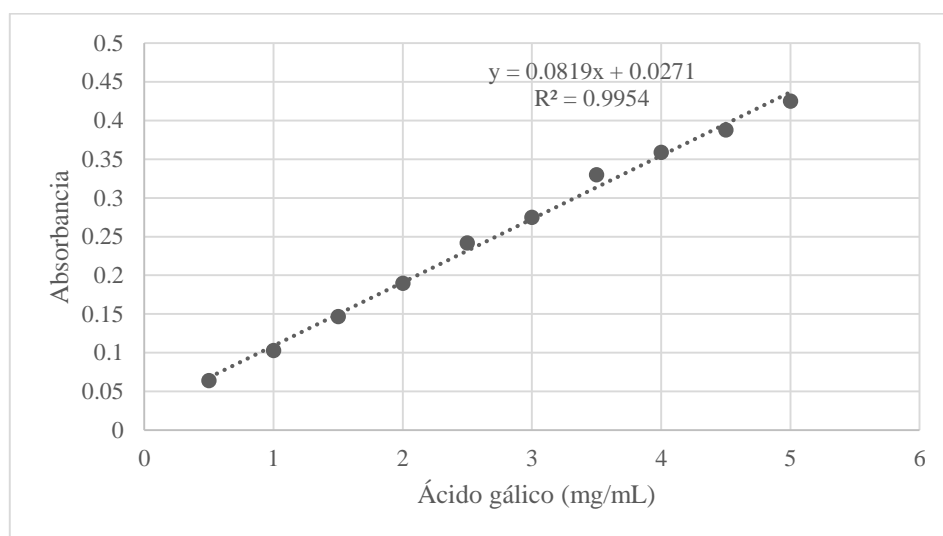


Figura 16. Curva patrón de fenoles totales.

Anexo 2. Determinación de antocianinas

Para la determinación de antocianinas se realizaron las siguientes soluciones:

- A) Buffer de cloruro de potasio (KCl) 0.025M. Se pesaron 0.0279 g de cloruro de potasio (KCl), se disolvieron en 10 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 1 con HCl concentrado, finalmente se aforó a 15 mL con agua destilada.
- B) Buffer de acetato de sodio (CH₃CO₂Na) 0.4 M. Se pesaron 0.4918 g de acetato de sodio (CH₃CO₂Na), se disolvieron en 10 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 4.5 con HCl concentrado, finalmente se aforó a 15 mL con agua destilada.

Se tomaron 2 alícuotas del extracto a analizar (2 mL cada una). Una de las alícuotas se diluyó con 2 mL de buffer pH 1.0, la segunda alícuota se diluyó con 2 mL del buffer pH 4.5. Se realizó un barrido en el espectrofotómetro de 400 a 700 nm y se registró la absorbancia del pico más alto, adicionalmente se leyó la absorbancia a 700 nm de cada una de las diluciones.

La cantidad de antocianinas totales de las muestras se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas totales} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(A)(PM)(FD)(1000)}{\epsilon * 1}$$

Donde

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

PM: peso molecular de antocianina (449.02 g/mol)

FD: factor de dilución

ϵ : coeficiente de extinción molar (26,900 L/cm mol)

Anexo 3. Determinación de capacidad antioxidante por el método ABTS^{•+}

Para la determinación de capacidad antioxidante por ABTS^{•+} se realizaron las siguientes soluciones:

- A) Solución stock de ABTS 7 mmol. Se pesaron 0.0384 g de ABTS y se aforó a 10 mL con agua destilada.
- B) Solución de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) 140 mmol. Se pesaron 0.3780 g de K₂S₂O₈ y se aforaron a 10 mL con agua destilada.
- C) Solución stock de TROLOX 1 mmol. Se pesaron 0.0025 g de TROLOX y se aforaron a 10 mL con metanol.

Se mezclaron 10 mL de solución de ABTS con 176 µL de solución de K₂S₂O₈ (*solución A*), dicha solución se dejó reposar durante 12 horas a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Transcurrido el tiempo se diluyó la solución tomando 500 µL de la *solución A* y adicionando etanol concentrado poco a poco hasta obtener una absorbancia de 0.74 leído a 734 nm.

La curva patrón se realizó de acuerdo con la siguiente tabla.

Tabla 12. Preparación de la curva patrón de ABTS^{•+}.

TROLOX (mmol)	TROLOX (mL)	Metanol (mL)
1	10	
0.8	8	2
0.6	7.5	2.5
0.4	6.6	3.4
0.2	5	5
0.1	5	5
0.01	1	9

Se tomaron 50 µL de cada una de las diluciones de TROLOX preparadas o del extracto a analizar y se añadieron 1500 µL de la solución ABTS diluida, se agitaron vigorosamente con vórtex y se dejaron reposar durante 10 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Se midió la absorbancia de cada una de las preparaciones a 734 nm calibrando el espectrofotómetro con metanol. Asimismo, se preparó un blanco adicionando 1550 µL de la solución de ABTS^{•+}.

La capacidad antioxidante y el porcentaje de inhibición de la muestra se calcularon de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$TEAC (mmol) = \left(\frac{D.O + b}{m} \right) * FD$$

Donde:

D.O: absorbancia de la muestra a 734 nm

b: ordenada al origen

m: pendiente

FD: factor de dilución

El resultado se expresó como capacidad antioxidante equivalente de TROLOX (mmol).

La curva patrón de muestra en la Figura 17.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Ab - Am}{Ab} \times 100$$

Donde

Ab: absorbancia del blanco a 734 nm

Am: absorbancia de la muestra a 734 nm

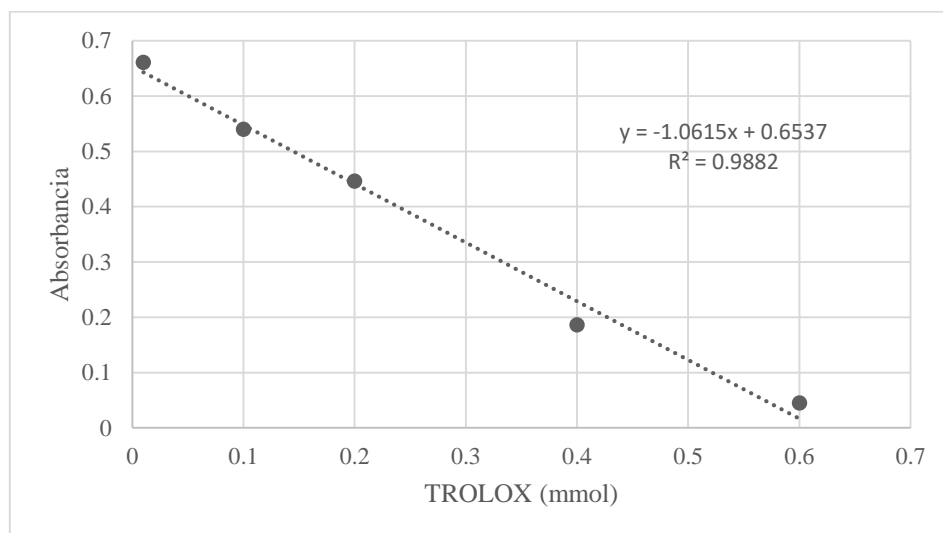


Figura 17. Curva patrón de ABTS^{•+}.

Anexo 4. Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH•

Para la determinación de capacidad antioxidante por DPPH• se utilizaron las siguientes soluciones:

- A) Solución stock de TROLOX (2 mmol). Se pesaron 0.0058 g de TROLOX y se aforaron a 10 mL con metanol.
- B) Solución del radical DPPH• (0.025 g/L). Se pesaron 0.0025 g de DPPH y se aforaron a 100 mL con metanol, protegiéndolo de la luz.

Para la curva patrón se realizaron diluciones a partir de la solución stock de TROLOX (1.2 mmol), de acuerdo con la siguiente tabla.

Tabla 13. Preparación de la curva patrón de DPPH•.

TROLOX (mmol)	TROLOX (mL)	Metanol (mL)
1.2	6	4
0.9	7.5	2.5
0.6	6.66	3.34
0.3	5	5
0.15	5	5
0.012	0.8	9.2
0.006	5	5

Se tomaron 1950 μ L de la solución del radical DPPH• y se colocaron en un tubo de ensayo, se adicionaron 50 μ L de las diluciones de TROLOX o de la muestra a analizar y se agitó la reacción con vórtex. Las preparaciones se dejaron reposar a temperatura ambiente en condiciones de obscuridad durante 30 min y se midió la absorbancia a 515 nm, se calibró el espectrofotómetro con metanol. Adicionalmente, se preparó un blanco colocando 2000 μ L de la solución DPPH•.

La capacidad antioxidante y el porcentaje de inhibición de la muestra se calcularon con base a las siguientes ecuaciones:

$$TEAC (mmol) = \left(\frac{D.O + b}{m} \right) * FD$$

Donde

D.O: absorbancia de la muestra a 734 nm

b: ordenada al origen

m: pendiente

FD: factor de dilución

El resultado se expresó como capacidad antioxidante equivalente de TROLOX (mmol).

La curva patrón se muestra en la Figura 18.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Ab - Am}{Ab} \times 100$$

Donde

Ab: absorbancia del blanco a 734 nm

Am: absorbancia de la muestra a 734 nm

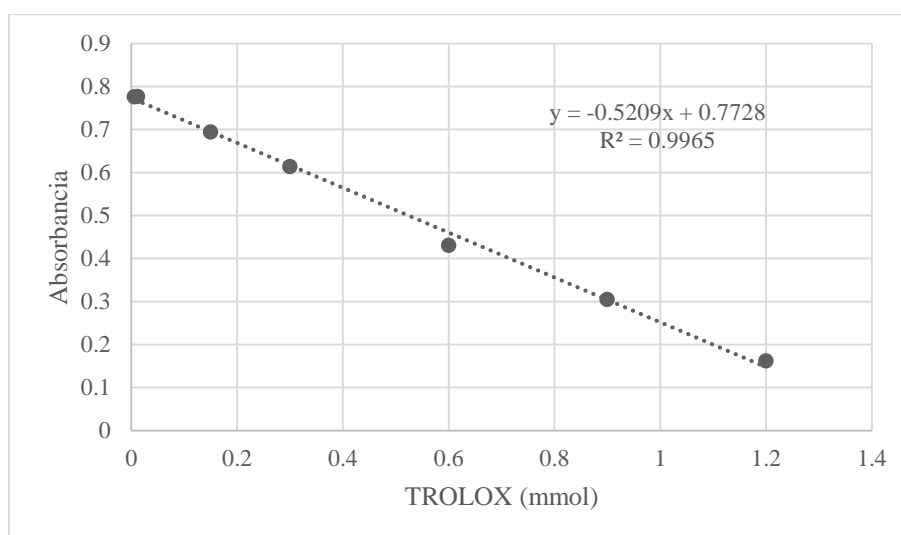


Figura 18. Curva patrón de DPPH.