

## CAPÍTULO 1

### 1.1 ANTECEDENTES

Un pigmento es un compuesto químico (cromóforo) que absorbe luz en el rango de longitud de onda de la región visible. La producción de luz se debe a la estructura de la molécula del compuesto, que reflejará la energía no absorbida que será percibida por el ojo humano, en donde se generarán impulsos que serán transmitidos al cerebro y serán interpretados como color (Brown, 1995).

Los pigmentos pueden ser clasificados tomando en cuenta algunas de sus características, como las siguientes (Delgado-Vargas, 2000):

- Origen: Pueden ser naturales, sintéticos o inorgánicos. los pigmentos naturales son los producidos por organismos vivos mientras que los sintéticos son producidos en el laboratorio. En cuanto a los pigmentos inorgánicos, pueden ser naturales o sintéticos.
- Estructura química del cromóforo: El cromóforo puede tener sistemas conjugados como los carotenoides, las antocianinas y las betalaínas, entre otros (Gross, 1987).
- Estructura de los pigmentos naturales: Encontramos a los derivados del tetrapirrol (clorofilas), los derivados de los isoprenoides (carotenoides), compuestos N-heterocíclicos (betalaínas), derivados del benzopirano (antocianinas) y quinonas (benzoquinonas).
- Como aditivos de alimentos: Pueden ser certificados y no certificados [Fennema, 1996], según la FDA.

### 1.2 GENERALIDADES DE LAS ANTOCIANINAS

La palabra antocianina deriva del griego anthos (flor) y kyanos (azul oscuro). Las antocianinas son las responsables de los colores rojos, azulados o violetas de la mayoría de las frutas y flores. Es el pigmento más importante, después de la clorofila, que es visible al ojo humano.

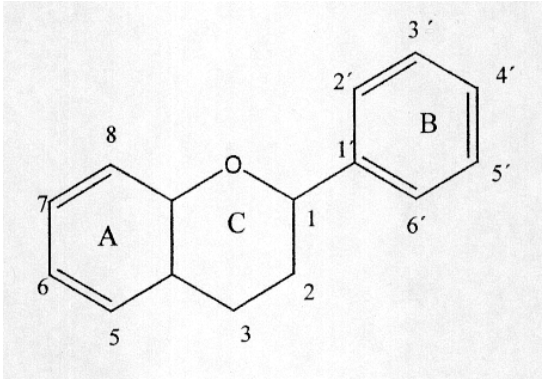
Pertencen a los compuestos fenólicos llamados flavonoides, que tiene un núcleo flaván basado en dos anillos aromáticos unidos por una unidad de tres carbonos (Figuras 1,2). En los anillos aromáticos A y B, los grupos hidroxilo u otros grupos son sustituidos en ciertas posiciones determinadas por el origen biosintético de los dos anillos aromáticos.

La función más importante de las antocianinas es la percepción visible para la atracción de animales para propósitos de polinización y dispersión de semillas. Han sido identificadas en manzanas, cerezas, moras, col morada, uva, fresa, rábano, ciruela, rosas rojas y arándano, entre otros. Hasta ahora no hay reportes de la toxicidad de las antocianinas, por lo que se consideran inofensivas a la salud, siendo una alternativa potencial en la industria alimenticia como un aditivo seguro y efectivo. Además se ha reportado poder terapéutico de estos compuestos flavonoides, como los que se mencionan más adelante.

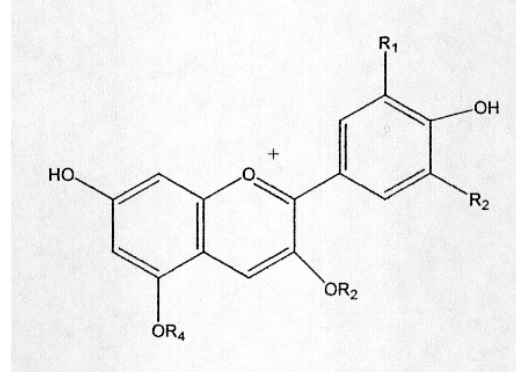
### **1.3 ESTRUCTURA QUÍMICA**

La estructura básica de las antocianinas es el 2-fenilbenzopirilo de la sal de flavilio (Figura 2). Las antocianinas existen como glicósidos de polihidroxi/polimetoxi derivados de la sal. Difieren en el número de grupos hidroxilo y/o metoxilo presentes, sitio, tipo y número de uniones de los azúcares a la molécula, además del tipo y número de ácidos alifáticos o aromáticos unidos a los azúcares. Los azúcares más comunes son glucosa, galactosa, arabinosa y xilosa. Estos azúcares pueden encontrarse en forma de di y trisacáridos formados por la combinación de las mismas. Los ácidos mayormente encontrados son el ácido cafeico, p-cumárico, sináptico, p-hidroxibenzoico, ferúlico, malónico, succínico y acético (Gross, 1987).

Cuando el azúcar es hidrolizado de la antocianidina, el producto es una aglicona, denominada antocianidina, de las cuales existen diversas en la naturaleza. Las antocianinas más importantes son 6 (Figura 3): pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvinidina. Cada una de ellas genera una intensidad de rojo diferente. El incremento de color es originado por la presencia de grupos auxóchromos, los cuales se caracterizan por ser electrodonadores, y cuando están en contacto con la antocianina producen el efecto mencionado (Fennema, 1996).

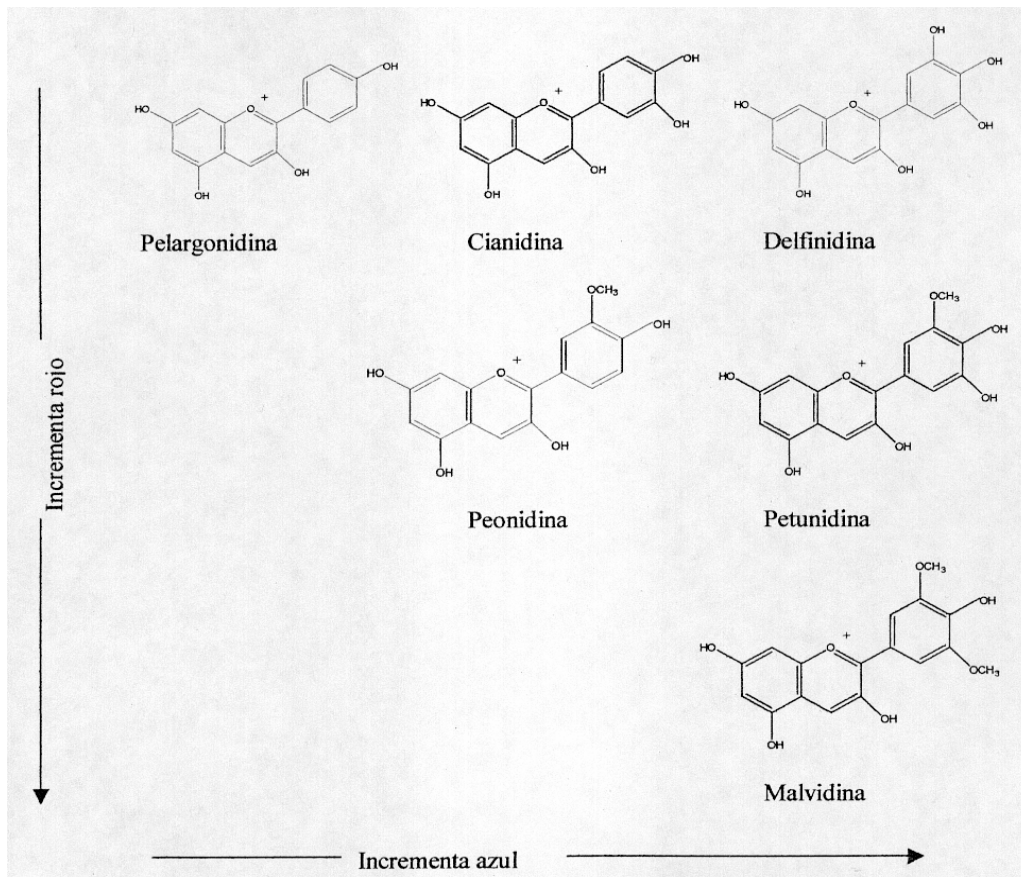


**Figura 1.** Estructura general de la antocianina, núcleo flaván (Gross, 1987).



**Figura 2.** Estructura de antocianina, catión flavilio (Fennema, 1996).

Debido a la poca solubilidad de las antocianinas en agua, éstas no se encuentran de manera libre en la naturaleza, sino en su forma glicosilada (antocianidinas). En esta estructura encontramos que el grupo hidroxilo de la posición 3 está siempre glicosilado, lo que le dará estabilidad y solubilidad al cromóforo (Walford, 1980). En cuanto a los residuos de glucosa, éstos siempre estarán acilados en su posición 6.



**Figura 3.** Estructura de las diferentes antocianidinas (Fennema, 1996).

## **1.4 DISTRIBUCIÓN**

Las antocianinas son los colorantes universales de plantas y son las responsables de los colores naranja, rosa, rojo, violeta y azul de los pétalos de flores y frutas. También se encuentran en otras partes de la planta como raíces y hojas, en donde se acumulan en las vacuolas de las células epidermales o subepidermales.

Las antocianinas aparecen transitoriamente en la ontogenia de la planta para la percepción o filtración de la luz o pueden acumularse como resultado de estrés. Dentro de las vacuolas, las antocianinas, pueden estar localizadas en organelos esféricos conocidos como antocianoplastos, que se forman mientras la síntesis de pigmentos esta en operación (Jiang, 2000, Lewis, 1995).

Las flavonas aparecen junto con las antocianinas y también participan en el color de las plantas como copigmentos. El mecanismo de copigmentación es exclusivo de la familia de las antocianinas e incluye asociaciones con flavonoides, polifenoles, alcaloides, ácidos orgánicos y otros compuestos de favilio. El papel que desempeñan estos copigmentos es el de proteger el catión flavilio de las antocianinas del ataque nucleofílico de las moléculas de agua y por lo tanto mantener el color intenso (Lewis, 1995).

## **1.5 BIOSÍNTESIS**

Los compuestos fenólicos son sintetizados por rutas diversas, entre las cuales dos son básicas: a ruta del ácido shikímico y la ruta del malonato. En la ruta del ácido shikímico se convierten carbohidratos simples derivados de la glicólisis, de la ruta de las pentosas fosfato y del ciclo de Calvin en diversos ácidos orgánicos como el cinámico, p-cumárico, cafeíco, ferúlico, clorogénico y fenilalanina (Figura 4). Esta última es incorporada en la porción C6-C3 de la estructura básica de los flavonoides, que correspondería al anillo aromático B y a los carbonos correspondientes al anillo central de pirano. Por el otro lado, el anillo A y el oxígeno del anillo pirano son proporcionados por la acetil-CoA (Taiz, 1998).

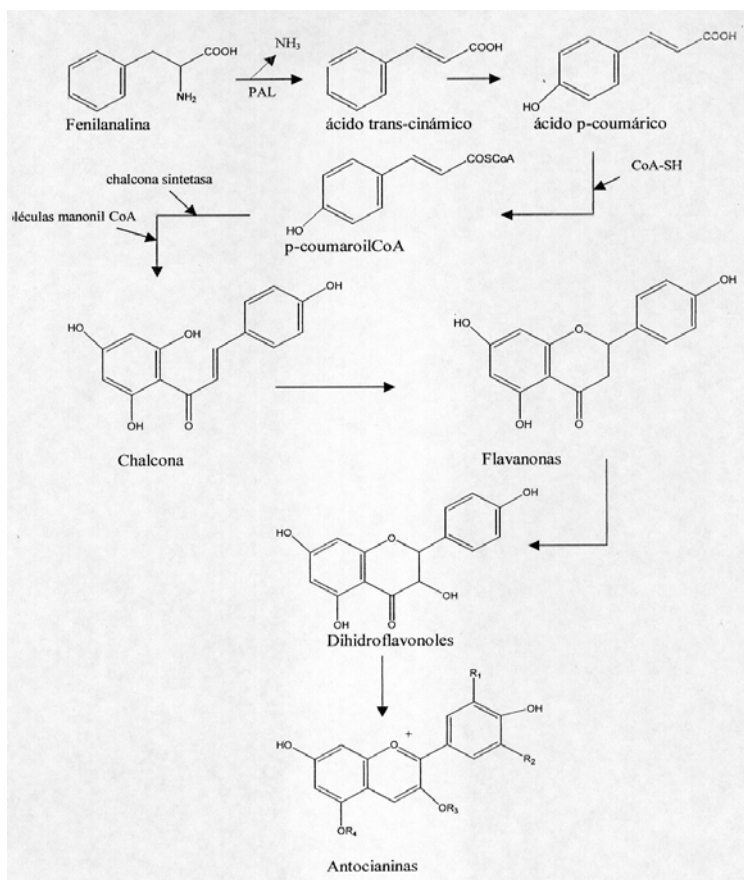


Figura 4. Ruta general de biosíntesis de las antocianinas (Delgado-Vargas, 2000).

## 1.6 ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS

Las antocianinas son sustancias relativamente inestables, teniendo un comportamiento aceptable únicamente en medio ácido. Se degradan, cambiando el color, por el pH, el calor, oxígeno, luz, hidrólisis de agliconas, sulfitos, ácido ascórbico, degradación enzimática y no enzimática (Wesche-Ebeling, 1984).

### 1.6.1 pH

Este parámetro es uno de los principales factores del medio que hace que la molécula pueda mantener su color. En condiciones ácidas se conserva un color intenso de la antocianina, ya que existirá un equilibrio entre las cuatro estructuras de la misma (Chandra et al, 1992). La protonación de la base quinoidal azul origina al catión flavilio rojo, que al hidratarse produce la pseudobase carbinol incolora, la cual existe un equilibrio con su chalcona incolora también.

En soluciones muy ácidas ( $\text{pH} < 0.5$ ) el catión flavilio rojo es la única estructura. Con incrementos de pH la concentración del catión decrece al mismo tiempo que la hidratación da lugar a la base incolora del carbinol incolora. Entre pH 4 y 5.5 habrá poco color, ya que las dos formas coloreadas estarán en bajas concentraciones y el equilibrio se desplazará a las formas incoloras. Por lo tanto, la forma chalcona es la más susceptible a la degradación, y la forma iónica flavilio es la más estable (Chandra, 1992; Wesche-Ebeling et al, 1996). Con esto se sabe que una de las desventajas de las antocianinas como colorantes de alimentos es la ausencia de color en soluciones ligeramente ácidas o neutras.

### **1.6.2 Temperatura**

La estabilidad de la antocianina está directamente relacionada con la temperatura. Las conversiones estructurales de las antocianinas son reacciones endotérmicas. Resisten bien los procesos térmicos alta temperatura-corto tiempo. Por efecto del calor (a temperaturas por encima de  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) se degradan según una cinética de primer orden. En general, las características estructurales que conducen a una mayor estabilidad al pH son las mismas que conducen a una mayor estabilidad térmica. Por lo tanto, las antocianinas altamente hidroxiladas son menos estables térmicamente que las metiladas, glicosiladas o acetiladas (Fennema, 1996).

### **1.6.3 Luz**

Se ha reconocido que la luz es un factor que acelera la degradación de las antocianinas. Se ha observado que la sustitución del hidroxilo en C-5 hace que la antocianina sea más susceptible a la fotodegradación. Sin embargo, la copigmentación puede retrasar esta fotodegradación, cuando ésta se presenta con flavonas polihidroxiladas, isoflavonas y auronas sulfonadas. (Delgado-Vargas, 2000).

### **1.6.4 Oxígeno**

El oxígeno molecular hace muy susceptible a la molécula insaturada de la antocianina. Las antocianinas son rápidamente oxidadas y degradadas cuando éstas se encuentran principalmente en su forma quinoidal (Wesche-Ebeling, 1984). Por lo tanto la remoción de dicho oxígeno genera una prevalencia más amplia del color, por lo que el procesado de los alimentos con antocianinas se lleva a cabo bajo condiciones de vacío o nitrógeno (Fennema, 1996).

### **1.6.5 Metales**

Los complejos con metales con características de cada una de las plantas, con los cuales se determina un espectro de colores único de cada una de ellas. Iones metálicos como aluminio, estaño y hierro pueden formar complejos con las antocianinas que contienen grupos hidroxilo en el anillo fenólico. El acomplejamiento puede formar efectos batocrómicos hacia el azul con el hierro y aluminio (Fennema, 1996).

Se ha demostrado que el acomplejamiento con metales puede incrementar y estabilizar el color de las antocianinas en los alimentos, pero los mismos también pueden provocar pérdidas del color, ya que considerando la habilidad de los metales como cobre y hierro de actuar como catalizadores redox generan un resultado neto negativo (Walford, 1980).

### **1.6.6 Azúcares**

Los azúcares a altas concentraciones estabilizan a las antocianinas (Lewis, 1995). Esto es debido a que a altas concentraciones se tiene una baja actividad del agua, que es uno de los factores de degradación de las antocianinas, por el ataque nucleofílico al catión flavilio que ocurre en el C-2 formando la base carbinol incolora. Por otro lado, cuando los azúcares están en bajas concentraciones no tendrán efecto sobre la actividad del agua, provocando que sus productos de degradación (hidroximetilfurfural y furfural) aceleren la degradación de las antocianinas (Hulme, 1971).

### **1.6.7 Ácido ascórbico**

El ácido ascórbico es un compuesto muy común en una gran variedad de frutas, y el cual varía dependiendo de la variedad de la fruta, el grado de madurez y la intensidad de la luz durante su crecimiento [Hulme, 1971]. Se ha observado que en presencia de oxígeno, el ácido ascórbico destruye a las antocianinas, ya que forma peróxido de hidrógeno durante la oxidación del mismo; esta reacción se acelera en presencia de cobre y es inhibida en presencia de flavonoles como la quercetina. El  $H_2O_2$  actúa rompiendo el anillo de pirilio de la antocianina por un ataque nucleofílico en C2 produciendo ésteres incoloros y derivados de la cumarina. Estos productos de degradación son totalmente destruidos y polimerizados para formar precipitados cafés (Fennema, 1996).

### **1.6.8 Dióxido de azufre**

El dióxido de azufre es un compuesto utilizado en la industria alimenticia como preservativo, pero muestra la desventaja que decolora a las antocianinas. Esta pérdida de color puede ser recuperada por acidificación o adición de compuestos con grupos carbonilo, como el acetaldehído (Wesche-Ebeling, 1984). Las antocianinas que son resistentes a este tipo de decoloración es debido a que tienen bloqueado el C-4 que es donde se une este compuestos, o bien existen como dímeros unidos por esta posición.

## **1.7 ESTABILIZACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS**

Uno de los principales objetivos de la industria alimenticia y farmacéutica es la sustitución de los colorantes sintéticos rojos, debido a su dudosa seguridad de consumo. Los principales sustituyentes son las antocianinas, pero su inestabilidad ante varios factores hace limitado su uso.

El color de las antocianinas es dado por su estructura resonante, lo cual también le confiere una inestabilidad, pero se puede ver modificada por la presencia de grupos hidroxilo, metoxilo, mono o diglucósidos y acilaciones, entre otros.

Algunos métodos probados para conferir estabilidad a la molécula de la antocianina, son: asociación intramolecular como la glicosilación y la acilación; asociación intermolecular, como la metaloantocianinas y copigmentación; interacciones con otros compuestos y copolimerización (Sarni-Manchado, 1996).

En esta investigación nuestro punto de interés es la copigmentación, ya que se ha demostrado anteriormente que las antocianinas copolimerizadas muestran mayor estabilidad hacia la degradación y otros factores que las afectan, por lo que se está en busca de nuevas alternativas de antocianinas capaces de copolimerizar y así conseguir la estabilización de los pigmentos naturales y por consiguiente la sustitución de los colorantes rojos sintéticos.



## 1.8 COPIGMENTACIÓN

Aunque las antocianinas son un grupo de pigmentos incoloros en un rango amplio de pH, hay mecanismos en la naturaleza que los mantiene como pigmentos altamente estables en valores de pH no favorables.

La copigmentación actúa produciendo un efecto hipercrómico en las antocianinas. Existe una amplia cantidad de compuestos que pueden llevar a cabo la tarea de copigmentación, como: flavonoides, polifenoles, alcaloides, aminoácidos y antocianinas, entre otros (Lewis, 1995). La copigmentación es un mecanismo de interacción molecular que previene el ataque nucleofílico del agua previniendo la decoloración del pigmento.

La formación de copigmento produce un incremento en la absorbancia del mismo a una longitud de onda visible (efecto hipocrómico) y un desplazamiento a longitudes de onda mayores del máximo de absorbancia (efecto batocrómico) (Walford, 1980).

Mientras el pH es mayor, el efecto batocrómico permanecerá inalterable, pero el efecto hipocrómico se consigue con el efecto inverso, que es un gran incremento en la absorbancia a todas las longitudes de onda del rango visible (Walford, 1980).

Cuando las antocianinas se encuentran en solución acuosa, el efecto de la copigmentación es dependiendo del tipo y la concentración de la misma, así como del copigmento, la temperatura, el pH y la composición del medio (Baublis, 1994). Cabe mencionar que la copigmentación se lleva a cabo en un rango de pH ácido.

Hay varias explicaciones por las cuales se demuestra la interacción de la antocianina con el copigmento. Una de ellas, propuesta por Somers y Evans, propone que el complejo antocianina-copigmento se forma por asociación electrostática de las formas rojas y azul de la antocianina y se estabilizan por interacción de cargas y puentes de hidrógeno con el copigmento. Sin embargo, otras evidencias definen una interacción molecular entre las estructuras coloreadas de las antocianinas y el copigmento, o también afirman la existencia de interacciones hidrofóbicas del núcleo aromático de la antocianina y el copigmento (Mazza, 1995).

## 1.9 ACTIVIDAD TERAPÉUTICA

Debido al incremento en el consumo de los productos procesados, la ingestión de antocianinas se ha visto disminuida (Bridle y Timberlake, 1997), por lo tanto la adición de antocianinas en sustitución de los colorantes sintéticos aumentaría su ingestión y por consiguiente sus propiedades terapéuticas que se les atribuyen.

Se ha demostrado que las antocianinas son flavonoides antioxidantes que protegen a muchos sistemas del cuerpo humano, ya que tiene propiedades antiinflamatorias, las cuales afectan al colágeno y al sistema nervioso (Caponio et al, 1999). Además tienen la habilidad de proteger los vasos sanguíneos del daño por los altos niveles de azúcar que causan complicaciones en la diabetes (Sterling, 2001).

En el curso de la inflamación, las enzimas dañan al sistema conectivo en los capilares, causando fuga de sangre hacia los tejidos adyacentes. Los oxidantes se liberan y después dañan las paredes de los vasos sanguíneos. Las antocianinas protegen de muchas maneras. Primero, ellas neutralizan las enzimas que destruyen el tejido conectivo. Segundo, su capacidad antioxidativa previene los oxidantes del tejido conectivo dañado. Finalmente, reparan proteínas dañadas en las paredes de los vasos sanguíneos. Experimentos en animales han mostrado que la suplementación con antocianinas previenen efectivamente la inflamación y el subsecuente daño a vasos sanguíneos. Esta habilidad antiinflamatoria de las antocianinas también ayuda a las reacciones alérgicas (Mayer, 1998).

Además se ha observado que su potencial antioxidante va en contra de radicales superóxidos y peróxidos de hidrógeno a través de numerosos mecanismos, por ejemplo: la cianidina: Protege la membrana celular de lípidos de la oxidación por una variedad de sustancias peligrosas. La cianidina es un antioxidante 4 veces más fuerte que la vitamina E. La pelargonidina protege el radical amino de la tirosina del peroxinitrilo, un antioxidante altamente reactivo. Por otro lado, la delfinidina interfiere con el radical hidroxil, uno de los oxidantes del cuerpo humano (Wrolstad, 2002). Cuando se ingieren, las antocianinas son destruidas en parte por la flora intestinal y las que son absorbidas se eliminan por la orina y la bilis, con previas transformaciones.

## **1.10 ESPECIE**

Debido al interés de la sustitución de los colorantes sintéticos por su posible toxicidad, se han buscado nuevas fuentes de colores naturales, como las antocianinas presentes en las rosas rojas. A pesar de las desventajas que presentan las antocianinas monoméricas, como las presentes en las rosas rojas, pelargonidina-3-glucósido, cianidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido, para ser consideradas como colorantes estables de alimentos y fármacos, se han propuesto diversos mecanismos para lograr dicha estabilización (Walford, 1980).

Las rosas rojas son de clima templado y cálido y presentan en su mayoría a las antocianinas antes mencionadas, las cuales les proporcionan su color característico. Las rosas rojas son consideradas una de las flores de ornamento más bellas, aunque es muy poco conocida su actividad terapéutica (Marshall, 1983).