7. RESULTADOS

7.1 PRIMERA PARTE

Para la primera parte se estudiaron 5 Sistemas: ácido vainíllico, ácido benzoico, ácido ascórbico, ácido gálico y ácido cafeico, teniendo una relación 1:1 pigmento-copigmento, y un Control con el pigmento solo. Las condiciones a las que fueron sometidos: temperatura de 50º C , pH 3 y ausencia de luz. Tomando los valores triestímulo de Hunter mostrados en la Tabla 2, se obtienen los valores de Tono, Pureza, Diferencia neta de color y luminosidad. Las concentraciones obtenidas de los sistemas modelo se muestran en la Tabla 3.

7.1.1 Tono

El cambio en el ángulo (Tono) de los sistemas modelo con respecto al tiempo es dado por la formula Tono = $\tan^{-1}$ (a/b). El Tono observado en la, es el siguiente: El comportamiento observado de los Sistemas de ácido vainíllico, ácido benzoico, ácido cafeico, ácido gálico y ácido ascórbico con respecto al Control es uniforme (Fig. 10), mientras que los Sistemas y el Control, presentan una variación final del ángulo con respecto al inicial. Esto hace suponer que la variación en el ángulo se debe a una disminución en el Tono rojo.

7.1.2 Pureza

En la Figura 11 se observa el cambio en la Pureza. Este parámetro se obtiene por la interacción de los tono rojos (+a) y amarillos (+b) de la escala de Hunter, con la fórmula Pureza = $(a^2 + b^2)^{1/2}$. Los Sistemas y Control tuvieron un comportamiento uniforme durante las primeras cuatro mediciones. En las tres mediciones posteriores se observa un cambio en la Pureza de los Sistemas y el Control. La Pureza aumentó para el Sistema con ácido vainíllico, haciendo suponer una copigmentación.

7.1.3 Diferencia Neta de Color (ΔE)

La Diferencia Neta de Color, ΔE, expresa la diferencia del color a un t_1 con respecto a un t_0, según la fórmula: $\Delta E = [(a-a_o)^2 + (b-b_o)^2 + (c-c_o)^2]^{1/2}$

En la Figura 12 se observan los cambios en ΔE de los Sistemas y Control. La variación de es uniforme durante las seis tomas de muestra, pero en la última toma se observa una separación de los Sistemas con respecto al Control, cuya variación en color es mayor con respecto a los Sistemas.

7.1.4 Luminosidad

La Luminosidad en la escala de Hunter es un parámetro que se extiende desde el negro ideal hasta el blanco ideal. La Luminosidad de los Sistemas y del Control presentan poca variación, ya que comienzan con una Luminosidad cercana a 83, y terminando en una Luminosidades entre 80 y 83 (Fig. 13).

7.1.5 Concentración

La concentración de antocianinas es un parámetro obtenido a partir de la absorbancia (ver fórmulas p. 20), por lo tal, un aumento en la absorbancia es un aumento en la concentración. En la Figura 14 se observa un aumento en la concentración de antocianina en los Sistemas y el Control, resaltando al Sistema con ácido vainíllico, ya que fue el que mostró una mayor concentración con respecto a los demás Sistemas.

7.1.6 CONCLUSION PRIMERA PARTE

El Tono y la Diferencia Neta de Color de los Sistemas y del Control mostraron un comportamiento similar, por lo que no se puede definir un copigmento para la segunda fase de la investigación a partir de estos parámetro. La Pureza y la Luminosidad del Sistema con ácido vainíllico fue mayor a la de los demás Sistemas, por lo que lo convierte un buen candidato para la segunda fase de la investigación. En la concentración de antocianina el Sistema con ácido vainíllico mostró un aumento con respecto a los

demás Sistemas. El aumento se puede deber al efecto hipercrómico de una copigmentación. Por los resultados obtenidos en Pureza, Luminosidad y concentración de antocianina se llega a la conclusión de que el ácido vainíllico es el mejor candidato para la segunda fase de investigación.

Tabla 2. Valores triestímulo de Hunter para el Control y los Sistemas.

Control	**Día 0**	**Día 5**	**Día 7**	**Día 11**	**Día 13**	**Día 15**	**Día 19**
LH	83.2	83.3	83.2	83.1	82.1	81.6	80.2
ah	16.4	16.4	16.2	16.9	17.5	18.6	19.1
bh	14.1	14.1	14.2	14.4	16.0	15.7	19.4

Vainíllico	**Día 0**	**Día 5**	**Día 7**	**Día 11**	**Día 13**	**Día 15**	**Día 19**
LH	83.2	83.3	83.1	83.2	82.5	81.8	80.7
ah	18.3	16.5	16.3	16.7	16.3	18.3	18.4
bh	13.1	13.9	14.4	14.7	16.8	15.5	18.4

Benzoico	**Día 0**	**Día 5**	**Día 7**	**Día 11**	**Día 13**	**Día 15**	**Día 19**
LH	83.0	83.6	83.7	84.3	84.1	84.1	83.7
ah	18.5	15.9	15.3	15.0	12.9	14.7	13.8
bh	13.2	13.7	13.7	13.4	14.5	12.8	15.4

Cafeico	**Día 0**	**Día 5**	**Día 7**	**Día 11**	**Día 13**	**Día 15**	**Día 19**
LH	83.2	83.6	83.7	84.2	84.0	83.5	82.5
ah	18.3	15.9	15.4	15.4	14.4	15.8	15.8
bh	13.1	13.7	13.7	13.2	14.7	13.2	16.6

Gálico	**Día 0**	**Día 5**	**Día 7**	**Día 11**	**Día 13**	**Día 15**	**Día 19**
LH	83.3	83.4	83.4	83.9	83.5	83.6	82.9
ah	18.2	16.2	15.8	15.7	14.8	15.8	15.0
bh	13.1	14.0	14.1	13.9	15.3	13.2	16.3

Ascórbico	**Día 0**	**Día 5**	**Día 7**	**Día 11**	**Día 13**	**Día 15**	**Día 19**
LH	82.8	83.4	83.4	83.8	83.5	83.4	82.7
ah	19.1	16.0	15.8	15.7	15.1	15.7	15.3
bh	13.6	14.0	14.1	13.8	15.1	13.9	16.2

Tabla 3. Se obtuvieron las concentraciones utilizando la formula de pH diferencial y antocianina monomérica. Las concentraciones están reportadas en Micromol L^{-1}

Tiempo	Control	Vainíllico	Benzoico	Cafeico	Gálico	Ascórbico
0	71.4	87	87.8	86.6	86.5	88.5
5	84.8	80.1	81.3	81.2	79.2	78.4
7	81.7	74.4	72.7	72.9	76.9	75.9
11	74.9	80.6	68	70	73.8	76
13	92.3	75.7	70.7	75.5	74.1	66.6
15	89.1	85.4	71.7	72.3	74.9	75.4
19	118	113	74	91.2	99.6	81.2

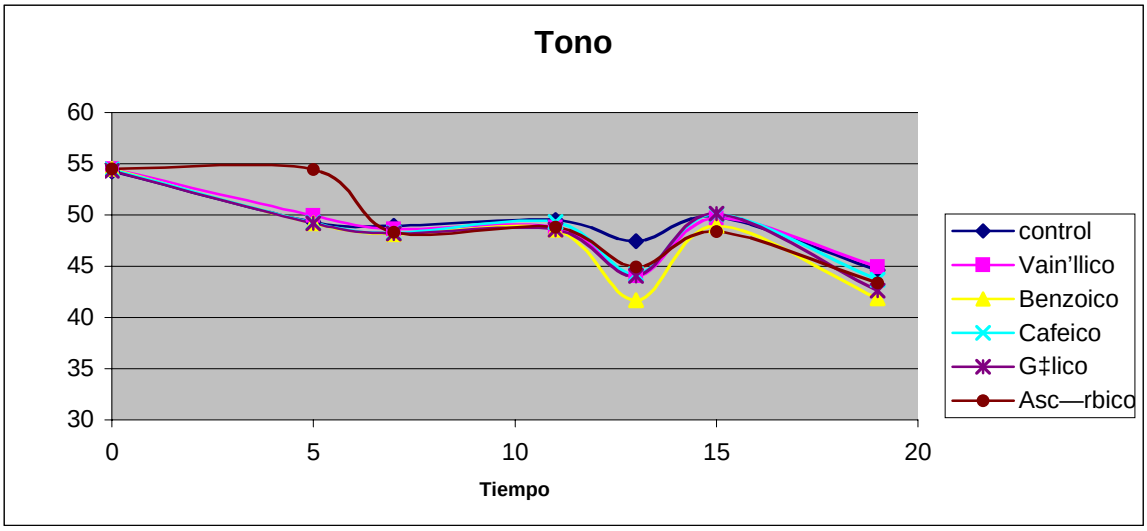


Figura 10. Comportamiento del Tono con respecto al tiempo (días).

Tabla 4. Variación en el Tono para el Control y los Sistemas.

Día	0	5	7	11	13	15	19
Control	54.3	49.3	48.9	49.5	47.4	49.8	44.6
Vainíllico	54.5	49.9	48.6	48.8	44.1	49.7	45.0
Benzoico	54.3	49.2	48.1	48.6	41.7	49.0	41.9
Cafeico	54.4	49.3	48.2	49.3	44.4	50.1	43.7
Gálico	54.3	49.2	48.2	48.5	44.1	50.1	42.6
Ascórbico	54.5	54.4	48.3	48.8	44.9	48.4	43.4

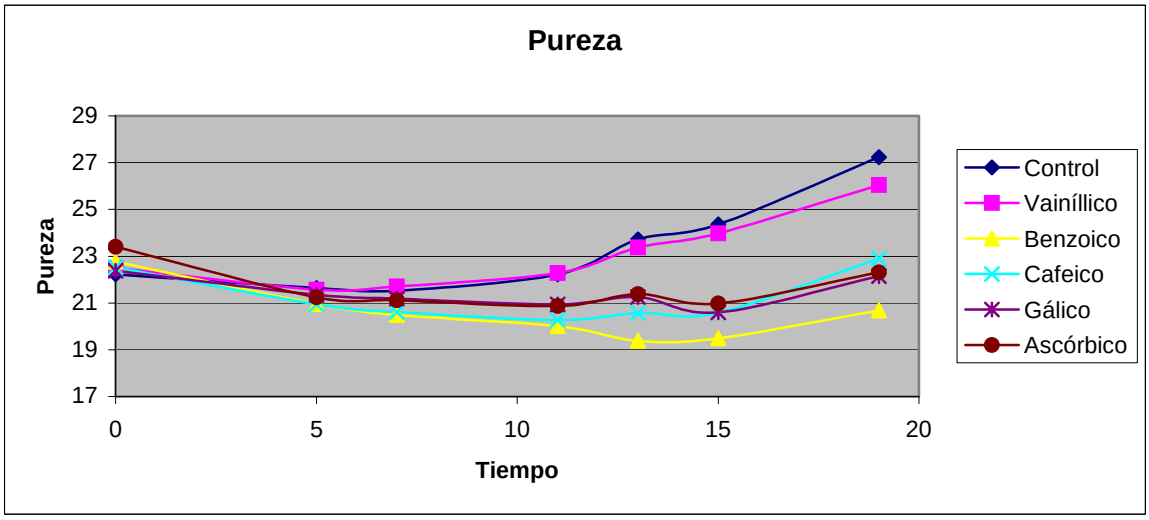


Figura 11. Comportamiento de la Pureza con respecto al tiempo (días).

Tabla 5. Variación en la Pureza para el Control y los Sistemas.

Día	0	5	7	11	13	15	19
Control	22.2	21.6	21.5	22.3	23.7	24.4	27.2
Vainíllico	22.5	21.6	21.7	22.3	23.4	24.0	26.1
Benzoico	22.8	21.0	20.5	20.0	19.4	19.5	20.7
Cafeico	22.5	21.0	20.6	20.3	20.6	20.6	22.9
Gálico	22.4	21.4	21.2	21.0	21.3	20.6	22.1
Ascórbico	23.4	21.2	21.1	20.9	21.4	21.0	22.3

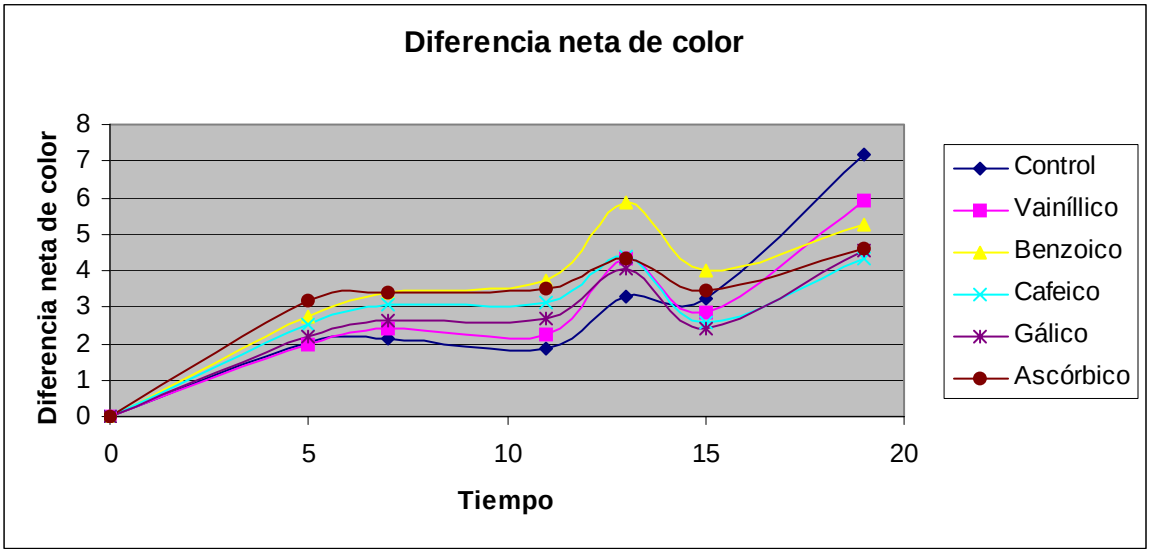


Figura 12. Comportamiento de la Diferencia Neta de Color con respecto al tiempo (días).

Tabla 6. Variación en la Diferencia Neta de Color para el Control y los Sistemas.

Día	5	7	11	13	15	19
Control	2.0	2.2	1.9	3.3	3.3	7.2
Vainíllico	2.0	2.4	2.3	4.3	2.9	5.9
Benzoico	2.8	3.4	3.8	5.9	4.0	5.3
Cafeico	2.5	3.1	3.1	4.4	2.6	4.3
Gálico	2.2	2.6	2.7	4.1	2.4	4.6
Ascórbico	3.2	4.0	3.5	4.3	3.5	4.6

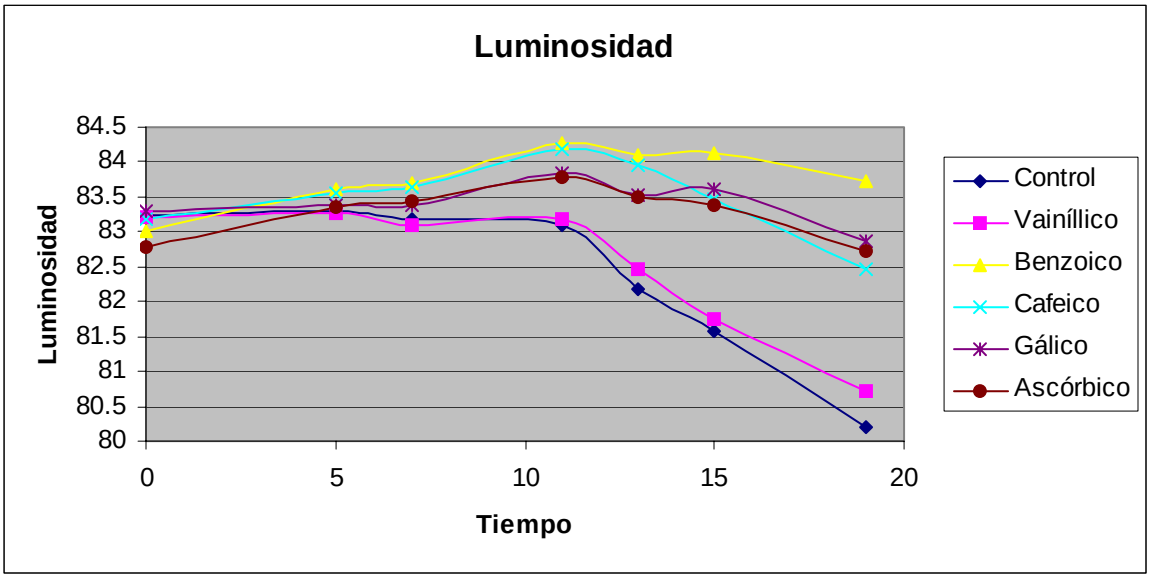


Figura 13. Comportamiento de la Luminosidad con respecto al tiempo (días).

Tabla 7. Variación en la Luminosidad para el Control y los Sistemas.

Día	0	5	7	11	13	15	19
Control	83.2	83.3	83.2	83.1	82.2	81.6	80.2
Vainíllico	83.2	83.3	83.1	83.2	82.5	81.8	80.7
Benzoico	83.0	83.6	83.7	84.3	84.1	84.1	83.7
Cafeico	83.2	83.6	83.7	84.2	84.0	83.5	82.5
Gálico	83.3	83.4	83.4	83.9	83.5	83.6	82.9
Ascórbico	82.8	83.4	83.4	83.8	83.5	83.4	82.7

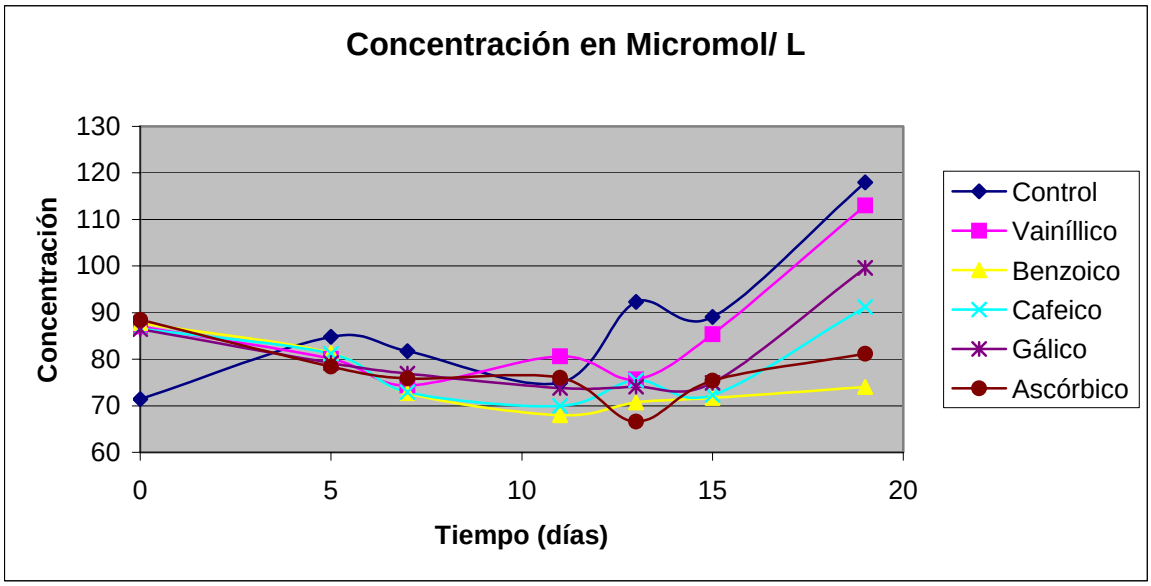


Figura 14. Comportamiento de la concentración de antocianina con respecto al tiempo (días).

Tabla 8. Variación en la concentración de antocianinas para el Control y los Sistemas. La concentración esta reportada en Micromol L^{-1}

Tiempo	Control	Vainíllico	Benzoico	Cafeico	Gálico	Ascórbico
0	71.4	87	87.8	86.6	86.5	88.5
5	84.8	80.1	81.3	81.2	79.2	78.4
7	81.7	74.4	72.7	72.9	76.9	75.9
11	74.9	80.6	68	70	73.8	76
13	92.3	75.7	70.7	75.5	74.1	66.6
15	89.1	85.4	71.7	72.3	74.9	75.4
19	118	113	74	91.2	99.6	81.2

7.2 RESULTADOS SEGUNDA FASE

En la segunda fase de la investigación se utilizó como copigmento al ácido vainíllico en los Sistemas con proporciones antocianina : copigmento = 1:1, 1:0.5 y 1:2. Las condiciones para la segunda fase de la investigación fueron las mismas que se utilizaron en la primera fase de la investigación: 50º C, ausencia de luz y pH 3. Tomando los valores triestímulo de Hunter mostrados en la Tabla 9, se obtienen los valores de Tono, Pureza, Diferencia neta de color y luminosidad. Las concentraciones obtenidas de los sistemas modelo se muestran en la Tabla 10.

7.2.1 TONO

El comportamiento observado de los Sistemas con ácido vainíllico a diferentes concentraciones es similar al del Control, por lo que no se puede concluir nada sobre el efecto del copigmento (Figura 15).

7.2.2 PUREZA

El Sistema con ácido vainíllico 1:1 mostró un comportamiento hacia valores mayores de Pureza con respecto a los demás Sistemas y el Control hacia el final del experimento (Figura 16).

7.2.3 DIFERENCIA NETA DE COLOR (ΔE)

En la última toma de muestra se observa una separación significativa de los Sistemas con respecto al control (Figura 17). El Sistema con ácido vainíllico 1:1 fue el que mejor comportamiento mostró, ya que tiende hacia cambios menores en ΔE.

7.2.4 LUMINOSIDAD

La luminosidad mostró un comportamiento uniforme hasta el día 15, mientras que a partir de esta fecha los Sistemas tienden a un disminuir su Luminosidad(Figura 18).

7.2.5 CONCENTRACION DE ANTOCIANINA

Se observa una declinación en la concentración de antocianina de los Sistemas y del Control. Esto puede deberse a la degradación de la antocianina. El Sistema con ácido vainíllico 1:1 mantuvo una concentración mayor con respecto a los demás Sistemas y el Control, y esto puede deberse a la protección del pigmento por copigmentación (Figura 19)

Tabla 9. Valores triestímulo de Hunter para el Control y los Sistemas.

Control

	Día 0	**Día 3**	**Día 6**	**Día 9**	**Día 16**	**Día 21**	**Día 25**
LH	84.6	86.4	87.1	88.0	89.5	89.8	89.9
ah	18.3	14.6	13.0	10.6	7.4	6.7	6.6
bh	9.2	7.8	7.3	7.1	6.6	6.6	6.8

Antocianina : Vainíllico 1 : 1

	Día 0	**Día 3**	**Día 6**	**Día 9**	**Día 16**	**Día 21**	**Día 25**
LH	84.6	86.2	87.2	88.0	89.4	89.3	88.5
ah	18.1	14.7	13.0	10.8	8.0	7.4	8.4
bh	9.1	7.8	7.3	7.2	6.9	7.1	8.1

Antocianina : Vainíllico 1 : 2

	Día 0	**Día 3**	**Día 6**	**Día 9**	**Día 16**	**Día 21**	**Día 25**
LH	84.6	86.3	87.2	87.9	89.6	89.7	89.5
ah	18.2	14.7	15.3	10.8	7.8	7.0	7.1
bh	9.1	7.7	7.3	7.2	6.7	6.6	7.2

Antocianina : Vainíllico 1 : 0.5

	Día 0	**Día 3**	**Día 6**	**Día 9**	**Día 16**	**Día 21**	**Día 25**
LH	84.6	86.3	87.2	88.2	89.5	89.6	89.3
ah	18.2	16.2	12.9	10.6	7.7	6.9	7.3
bh	9.0	7.7	7.2	7.0	6.7	6.7	7.2

Tabla 10. Concentraciones de antocianinas en los Sistemas y el Control. La concentración esta en Micromol L^{-1}

Tiempo	Control	Vainíllico 1:1	Vainíllico 1:2	Vainíllico 1:0.5
0	53.8	50.1	51.4	55.2
3	72.9	71.7	74.4	74.4
6	53.5	52.6	54	51.4
9	47.2	45	47	45.2
16	34.2	36.5	36.2	35.4
21	32.4	33.9	32.5	33.3
25	33	40.2	32.5	36.2

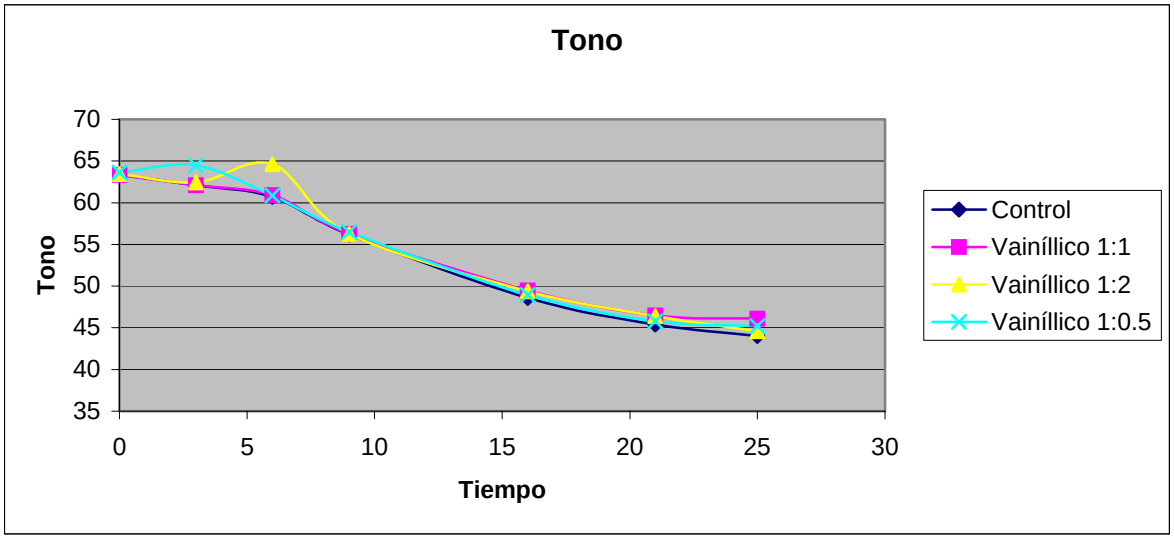


Figura 15. Comportamiento del Tono con respecto al tiempo (días).

Tabla 11. Variación en el Tono para el Control y los Sistemas.

Día	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 16	Día 21	Día 25
Control	63.4	62.1	60.7	56.2	48.6	45.4	44.0
Vainíllico 1:1	63.3	62.1	60.9	56.3	49.5	46.5	46.1
Vainíllico 1:2	63.4	62.4	64.6	56.3	49.4	46.4	44.6
Vainíllico 1:0.5	63.6	64.5	60.9	56.5	48.9	45.8	45.2

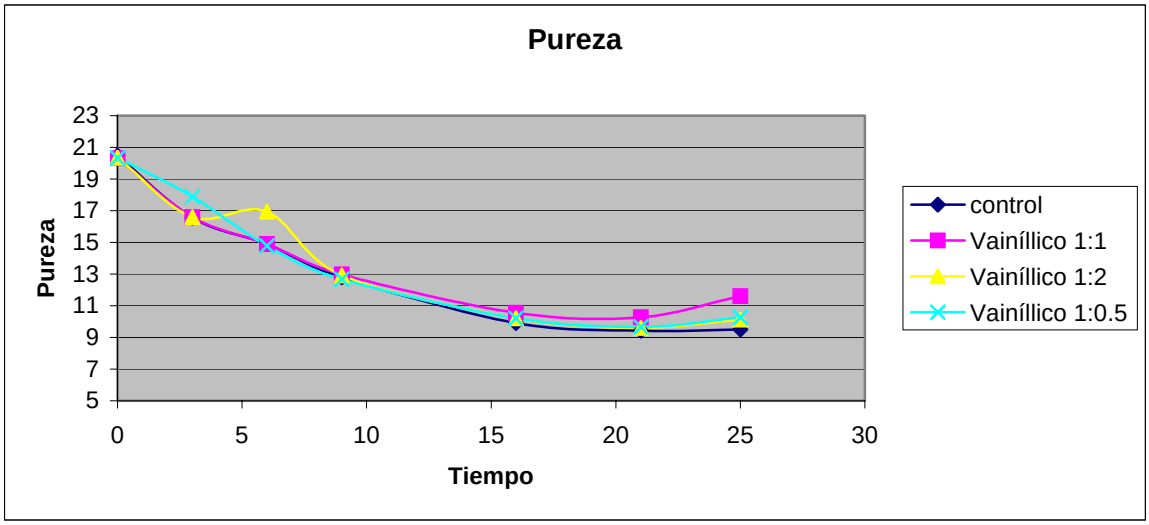


Figura 16. Comportamiento de la Pureza con respecto al tiempo (días).

Tabla 12. Variación en la Pureza para el Control y los Sistemas.

Día	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 16	Día 21	Día 25
Control	20.5	16.6	14.9	12.8	9.9	9.4	9.5
Vainíllico 1:1	20.3	16.6	14.9	13.0	10.6	10.3	11.6
Vainíllico 1:2	20.4	16.6	16.9	12.9	10.2	9.6	10.1
Vainíllico 1:50	20.4	17.9	14.8	12.7	10.2	9.7	10.3

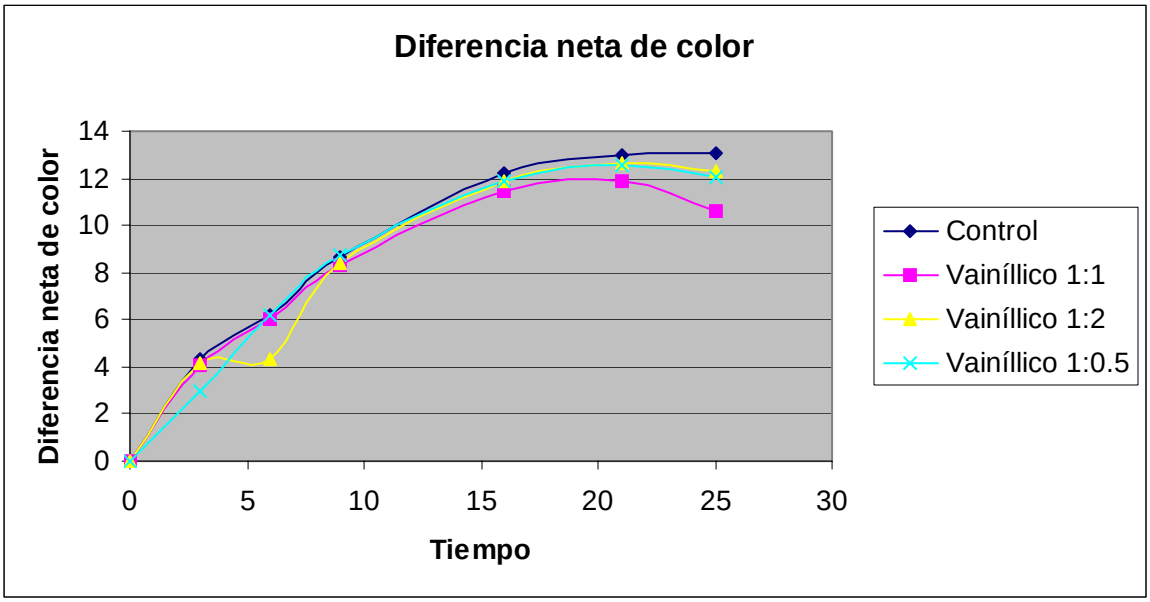


Figura 17. Comportamiento de la Diferencia Neta de Color con respecto al tiempo (días).

Tabla 13. Variación en la Diferencia Neta de Color para el Control y los Sistemas.

Día	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 16	Día 21	Día 25
Control	0	4.3	6.2	8.7	12.2	13.0	13.1
Vainíllico 1:1	0	4.1	6.1	8.3	11.4	11.9	10.6
Vainíllico 1:2	0	4.2	4.3	8.4	11.9	12.6	12.3
Vainíllico 1:0.5	0	3.0	6.2	8.7	11.8	12.6	12.1

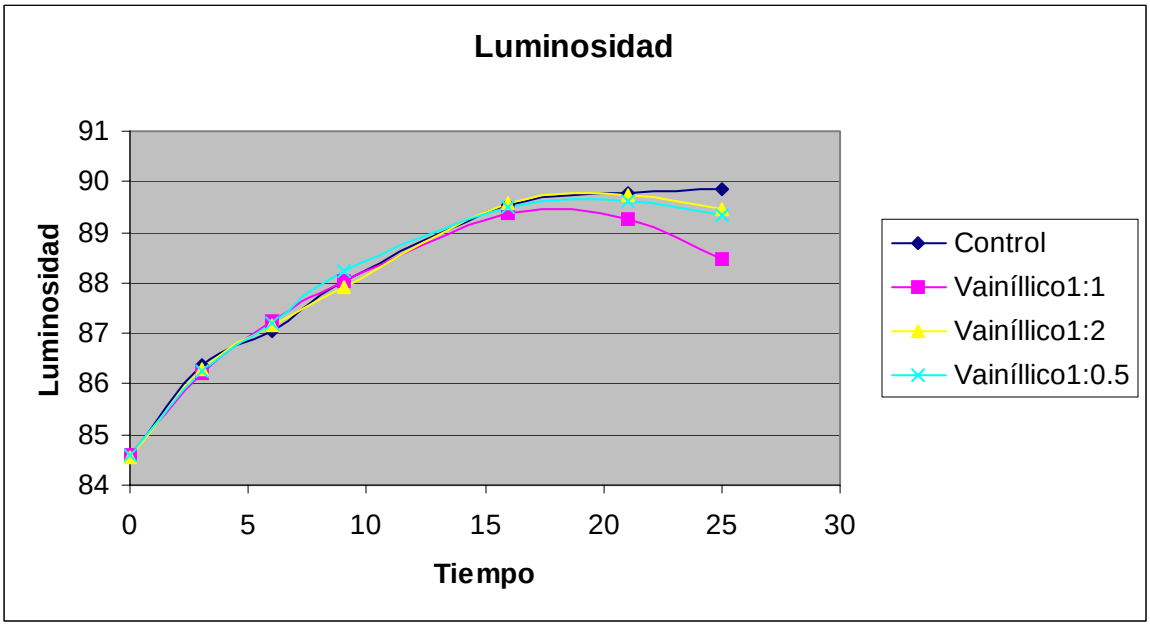


Figura 18. Comportamiento de la Luminosidad con respecto al tiempo (días).

Tabla 14. Variación en la Luminosidad para el Control y los Sistemas.

Día	Día 0	Día 3	Día 6	Día 9	Día 16	Día 21	Día 25
Control	84.6	86.4	87.1	88.0	89.5	89.8	89.9
Vainíllico 1:1	84.6	86.2	87.2	88.0	89.4	89.3	88.5
Vainíllico 1:2	84.6	86.3	87.2	87.9	89.6	89.7	89.5
Vainíllico 1:0.5	84.6	86.3	87.2	88.23	89.5	89.6	89.3

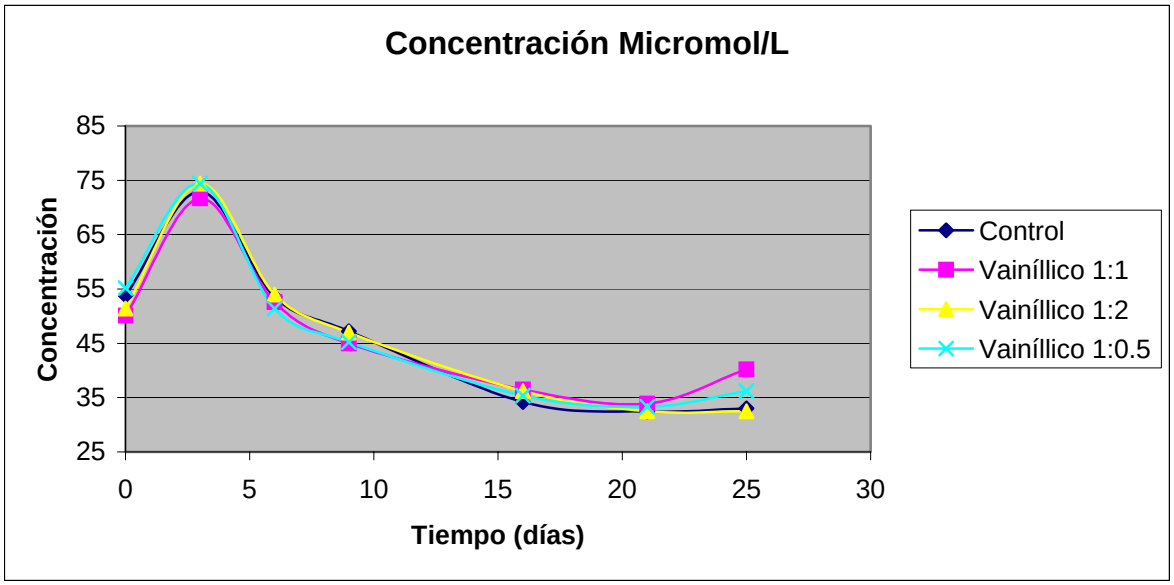


Figura 19. Comportamiento de la concentración de antocianina con respecto al tiempo (días).

Tabla 15. Variación en la concentración de antocianina para el Control y los Sistemas. La concentración esta reportada en Micromol L^{-1}

Tiempo	Control	Vainíllico 1:1	Vainíllico 1:2	Vainíllico 1:0.5
0	53.8	50.1	51.4	55.2
3	72.9	71.7	74.4	74.4
6	53.5	52.6	54	51.4
9	47.2	45	47	45.2
16	34.2	36.5	36.2	35.4
21	32.4	33.9	32.5	33.3
25	33	40.2	32.5	36.2

7.2.6 RESULTADOS DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

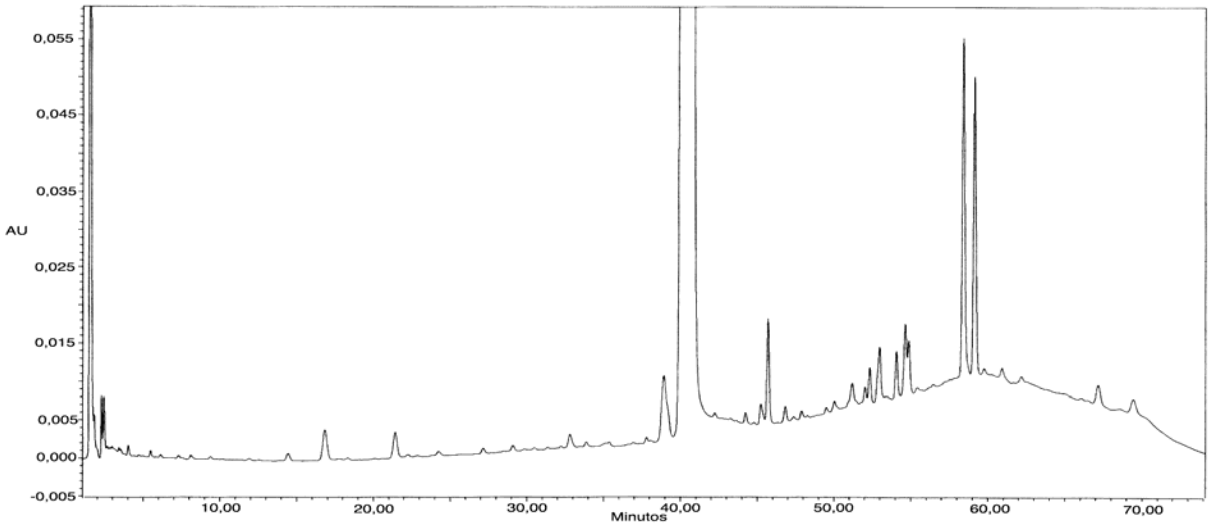
7.2.6.1 Resultados del Control

Se pueden observar los pequeños picos de pelargonidina-3-soforósido-5-glucósido acilada con ácido *p*-cumárico y malónico eluyendo a los 27 min (Figura 20; Giusti y Wrolstad, 1996) y pelargonidina-3-soforósido-5-glucósido acilada con ácido ferúlico a los 35 min (Figura 20; Giusti et al., 1998). Se puede suponer que los picos que aparecen a los 27 min y 35 min sean de la antocianina respectiva, más no se pueden asegurar estos resultados debido a que la antocianina estuvo en refrigeración por 5 meses, pudiendo alterar los resultados de los cromatogramas. Se pueden observar los picos que eluyen a los 58 min y 59 min (Figura 21), los cuales corresponden probablemente a las antocianinas aciladas, y el pico que aparece a los 54 min (Figura 21) probablemente corresponde a la aglicona pelargonidina.

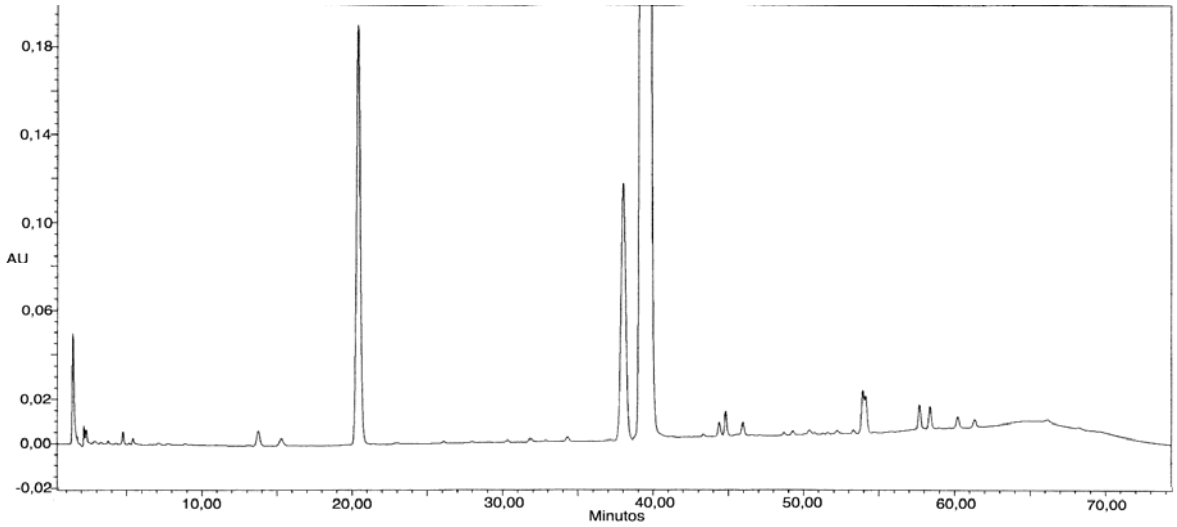
El pico que aparece a los 40 min es el del sorbato de potasio, como lo confirma el pico del sorbato solo (Fig. 21). El pico que aparece a los 39 min puede ser del sorbato de potasio que sufre alguna alteración. El pico que aparece a los 21 min en la Fig. 20 día 9 es una contaminación con ácido vainíllico (Fig. 28).

7.2.6.2 Resultados de los Sistemas antocianina : ácido vainíllico

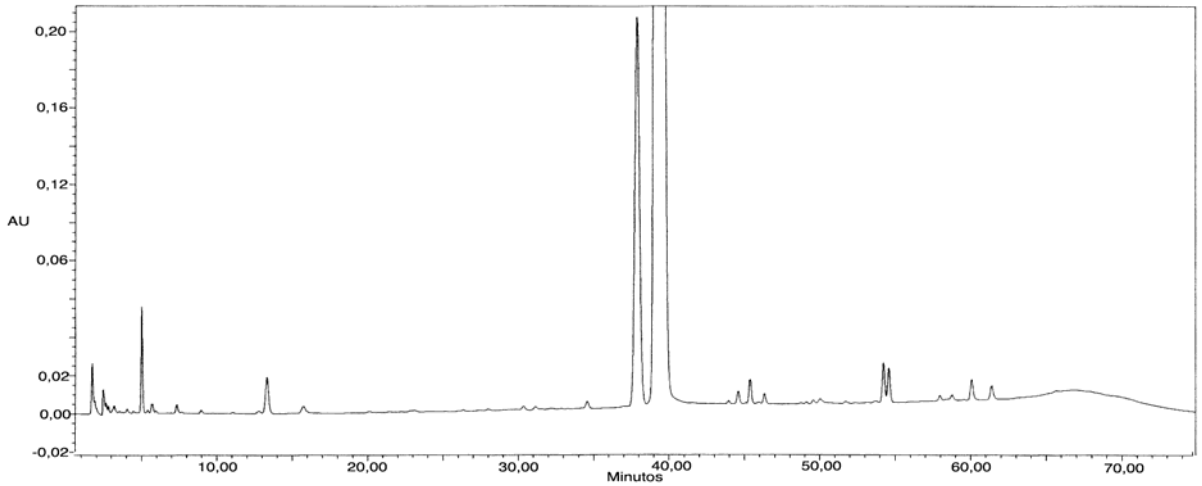
El pico que aparece a los 21 min (Figs. 22, 24 y 26) es el ácido vainíllico. No se notaron diferencias significativas en los cromatogramas a 254 nm, notándose el pico debido al sorbato de potasio (39-40 min). Se observa que se va formando un aducto que eluye poco antes del sorbato, posible producto de degradación. En los cromatogramas a 510 nm (Figs. 23, 25 y 27) se observa que las antocianinas van degradándose (58-59 min) , y al mismo tiempo, se van acumulando probablemente las antocianidina (54 min) y otro aducto con color a los 55 min.



Día 0

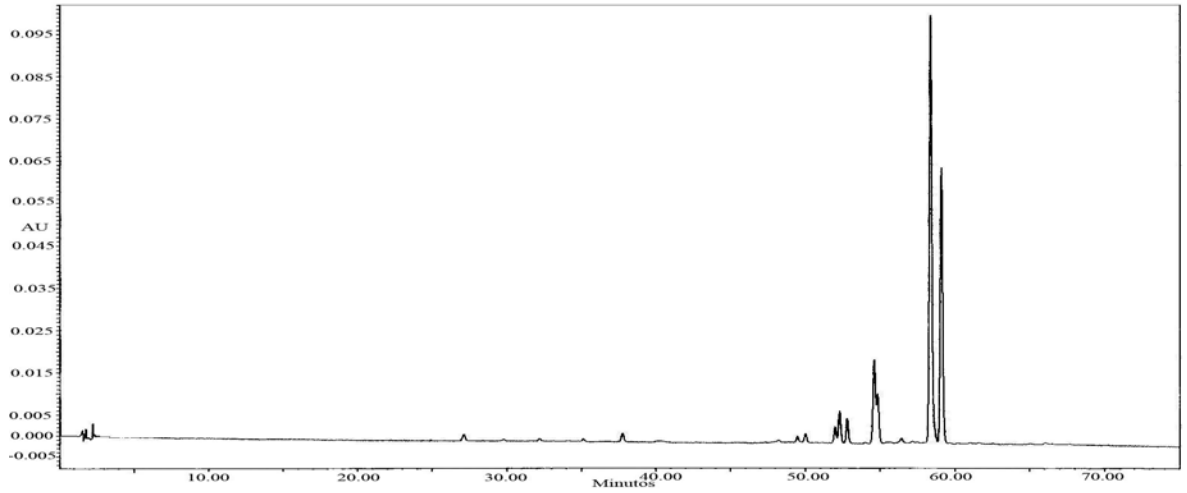


Día 9

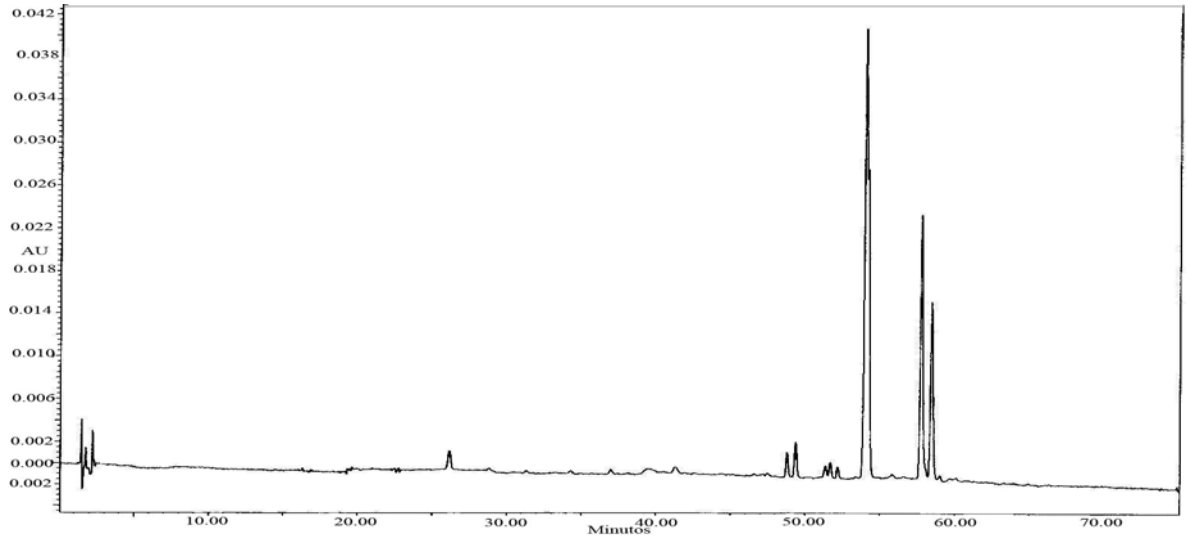


Día 21

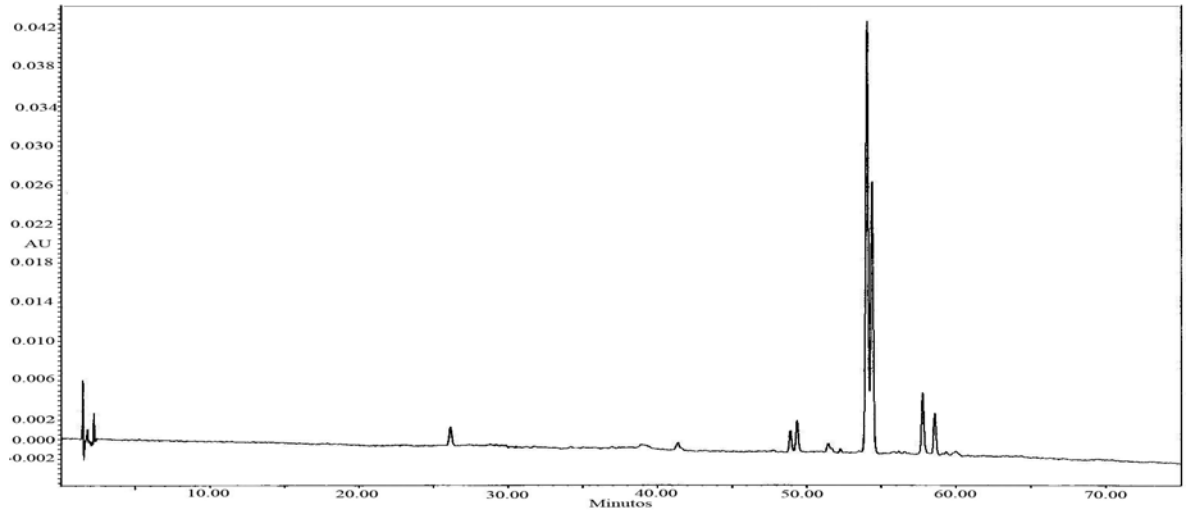
Figura 20. Cromatogramas del Control a 254 nm.



Día 0

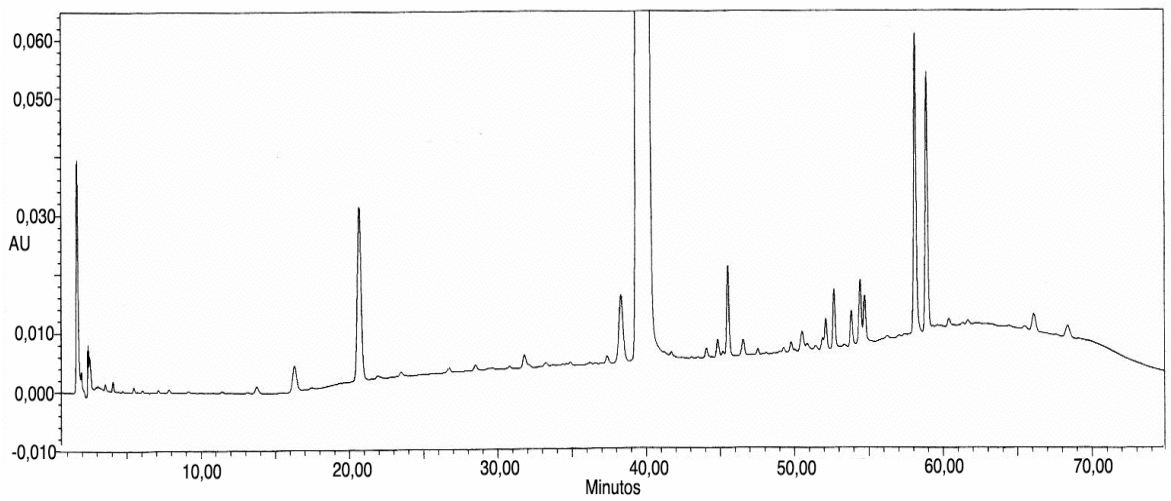


Día 9

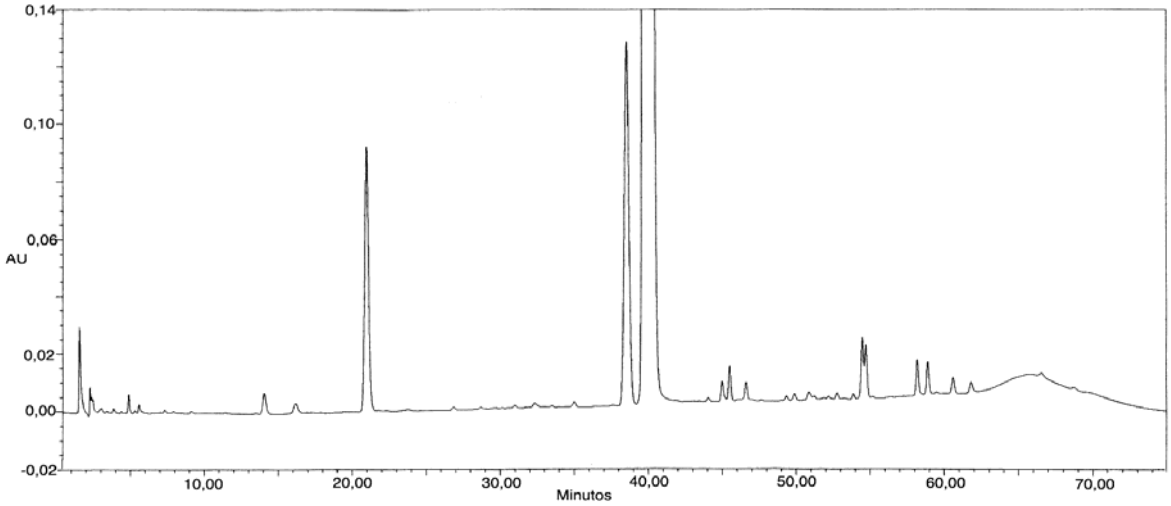


Día 21

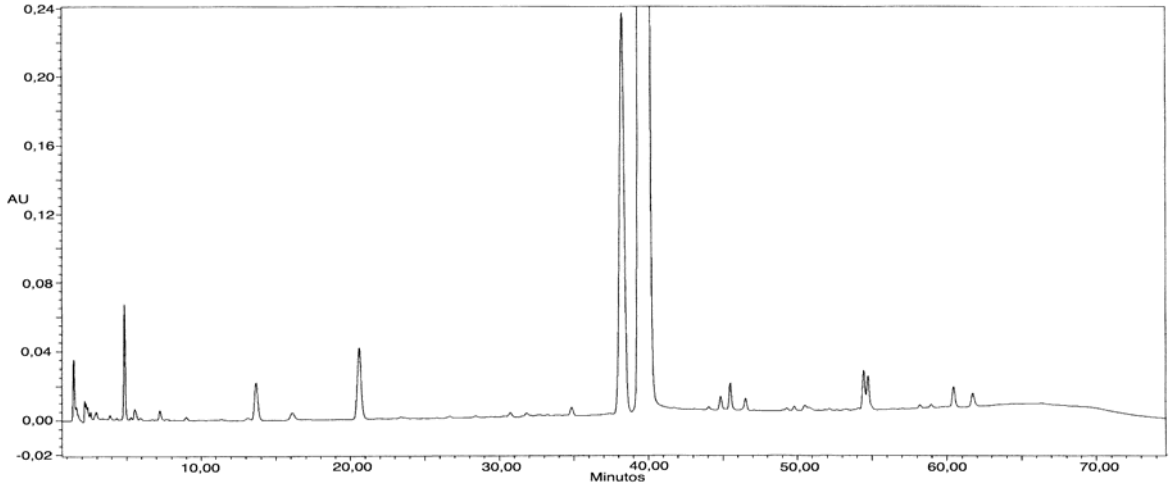
Figura 21. Cromatogramas del Control a 510nm.



Día 0

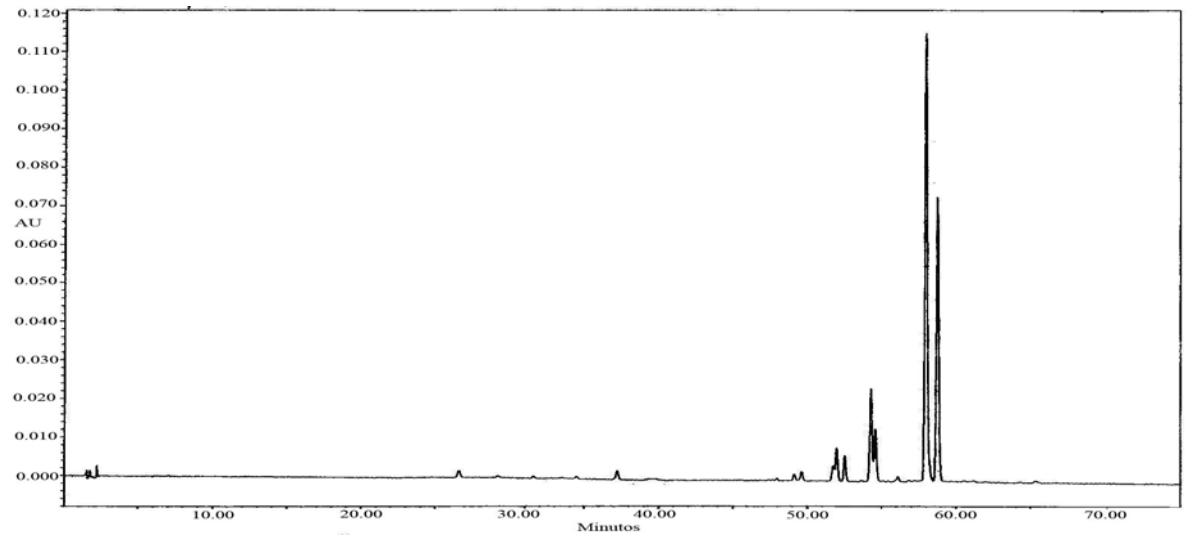


Día 9

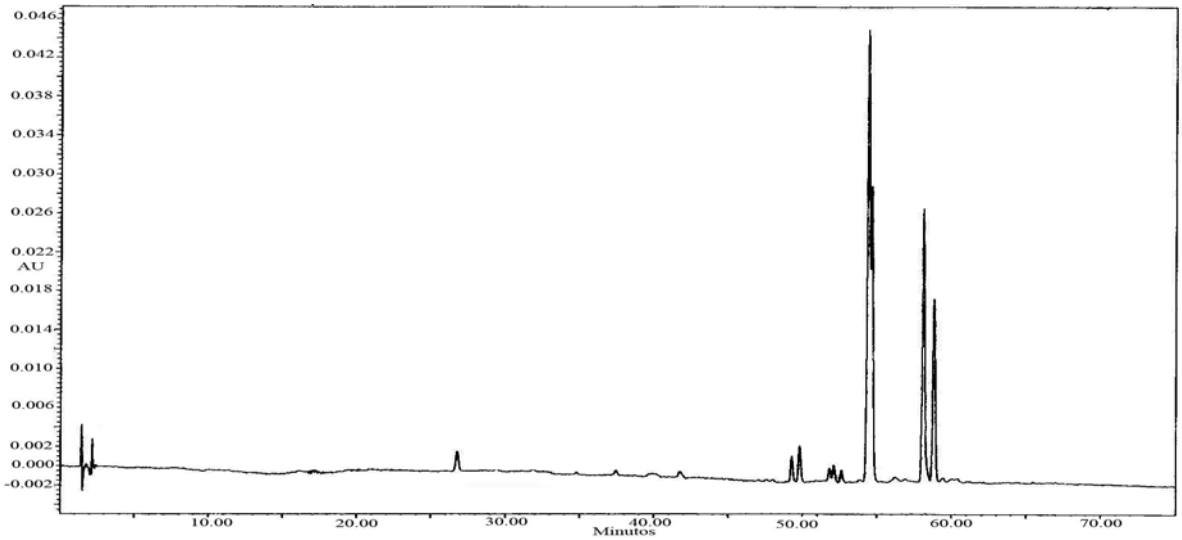


Día 21

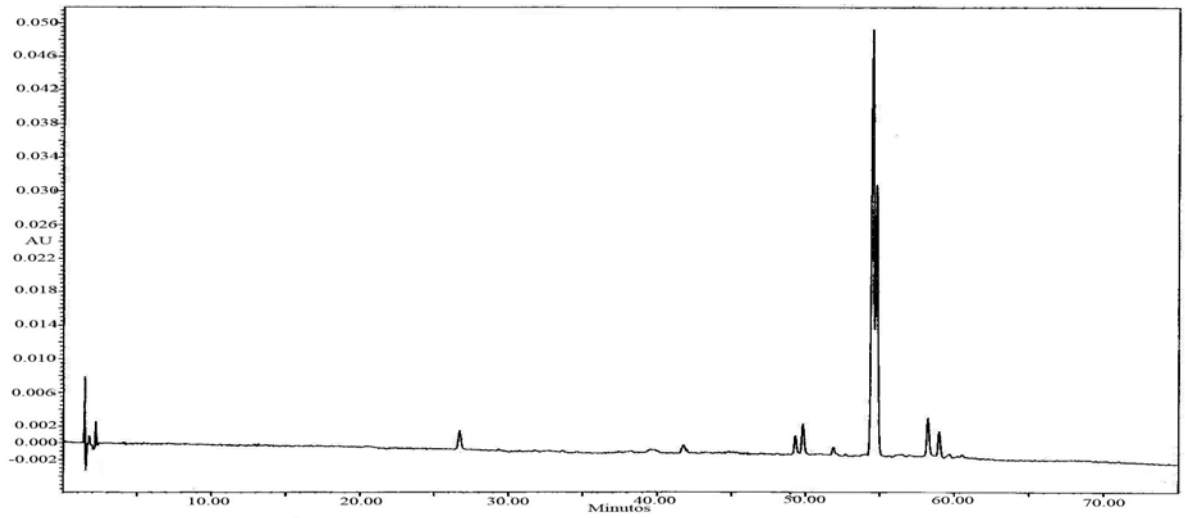
Figura 22. Cromatograma del Sistemas antocianina:ácido vainíllico 1:1 a 254 nm.



Día 0

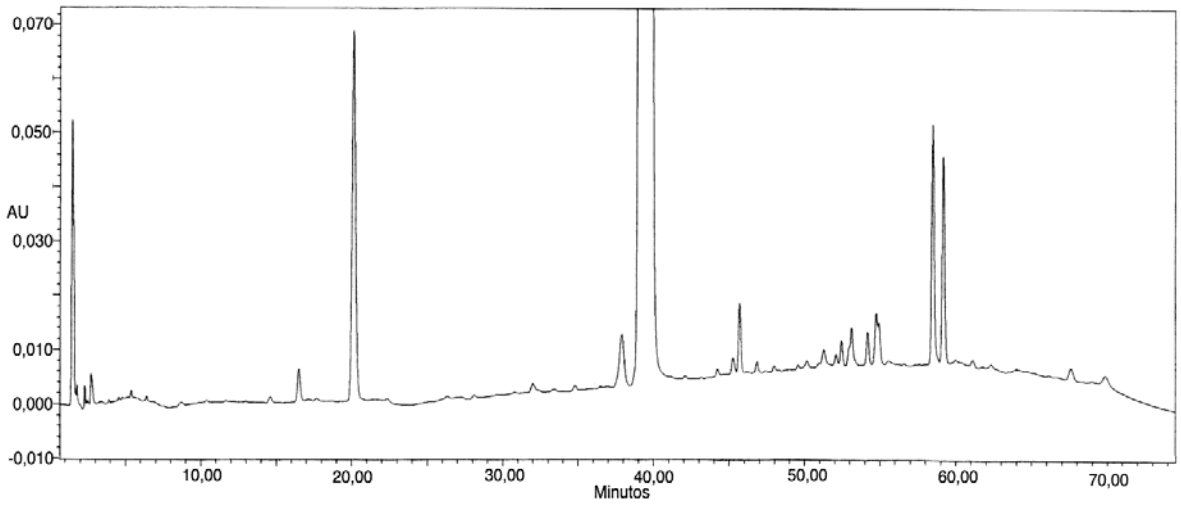


Día 9

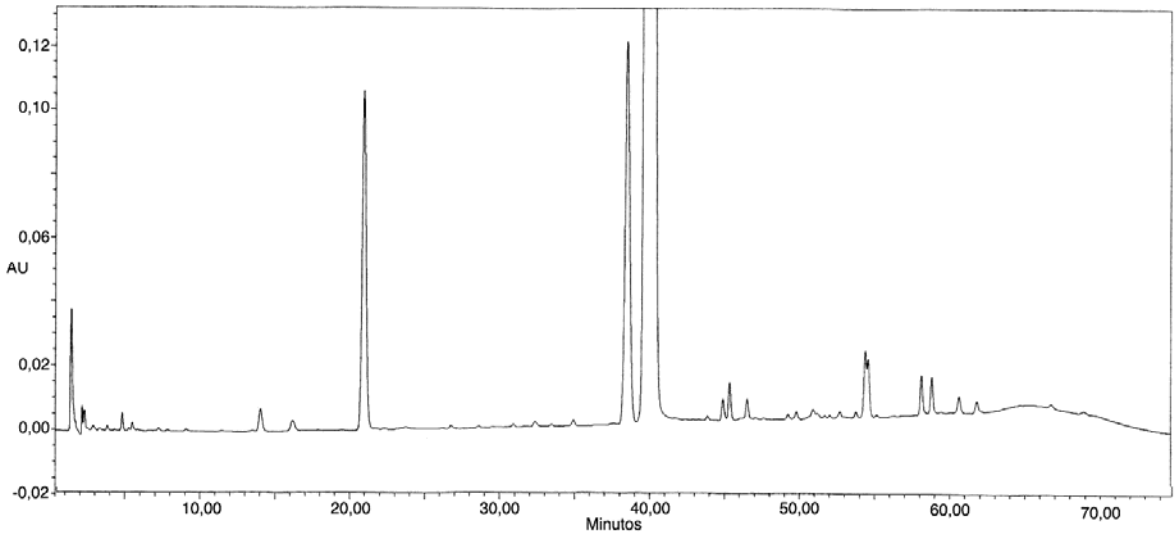


Día 21

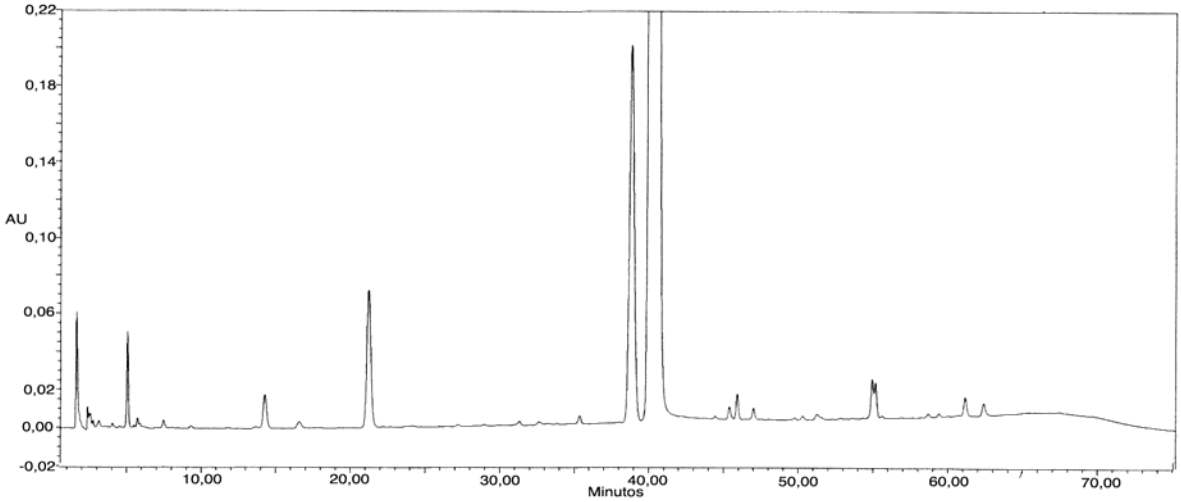
Figura 23. Cromatograma del Sistemas antocianina:ácido vainíllico 1:1 a 510 nm.



Día 0

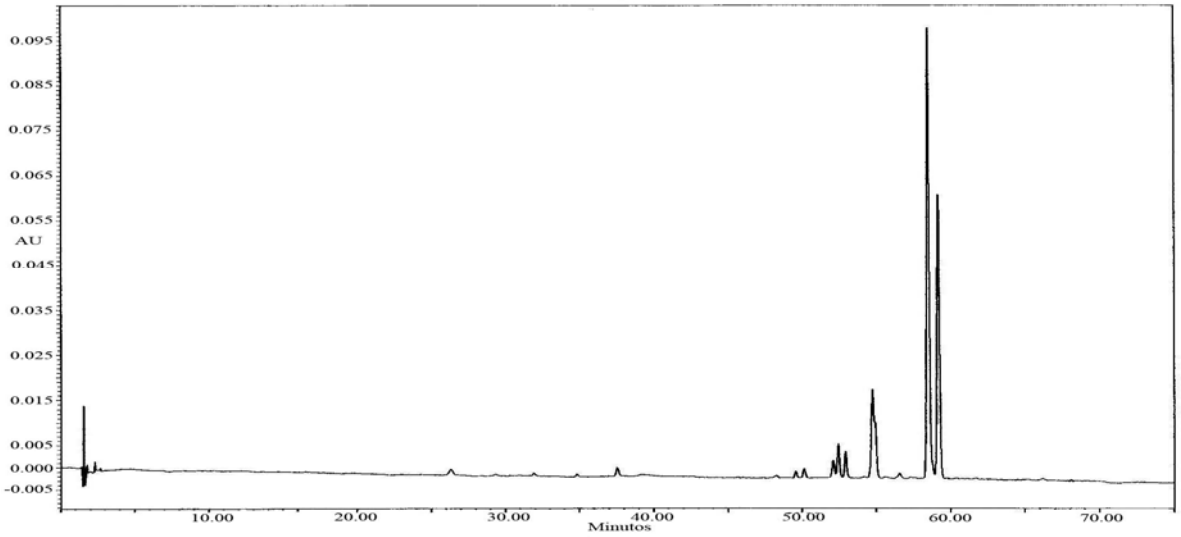


Día 9

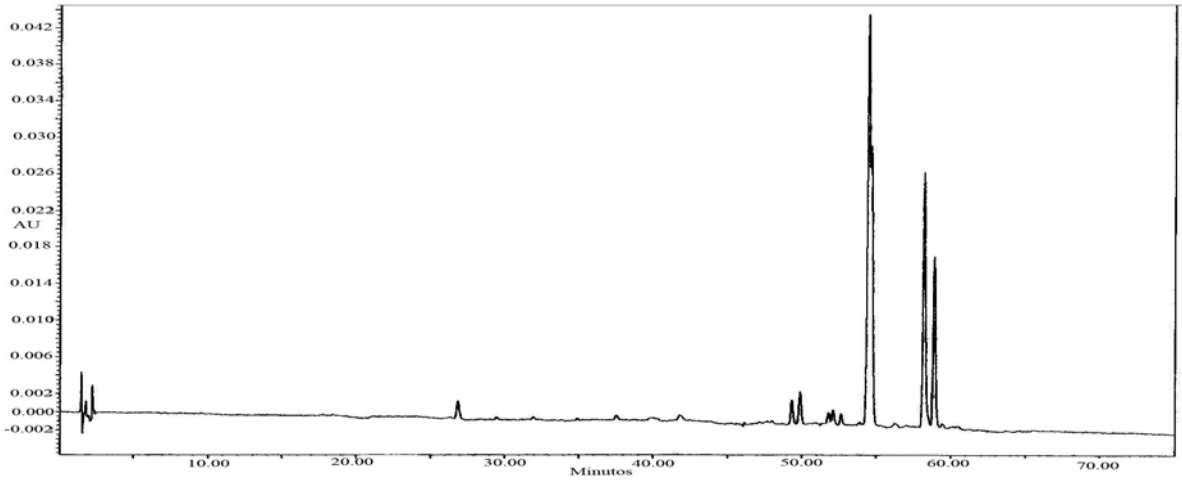


Día 21

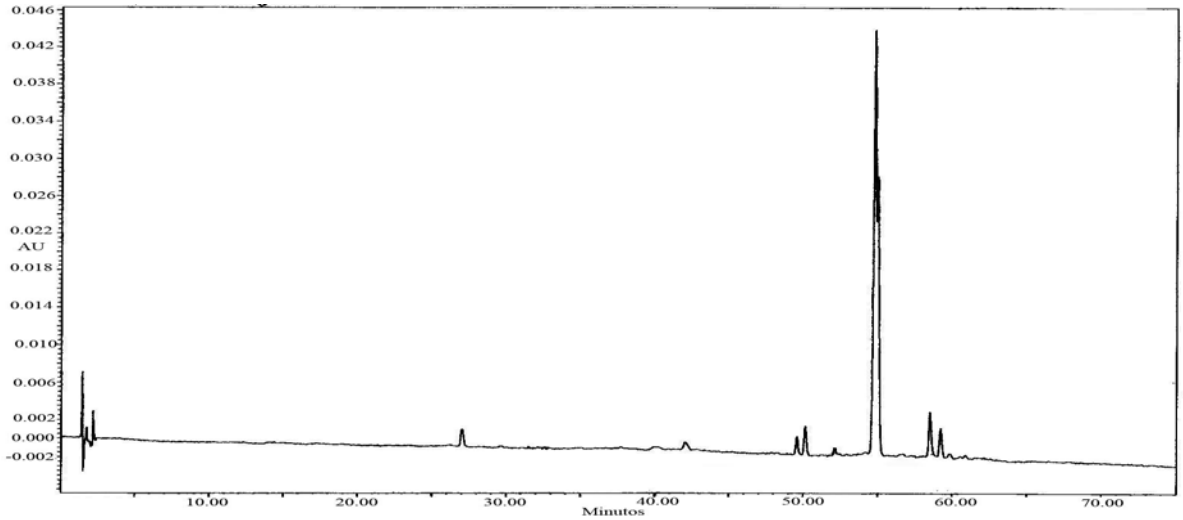
Figura 24. Cromatograma del Sistemas antocianina:ácido vainíllico 1:2 a 254 nm.



Día 0

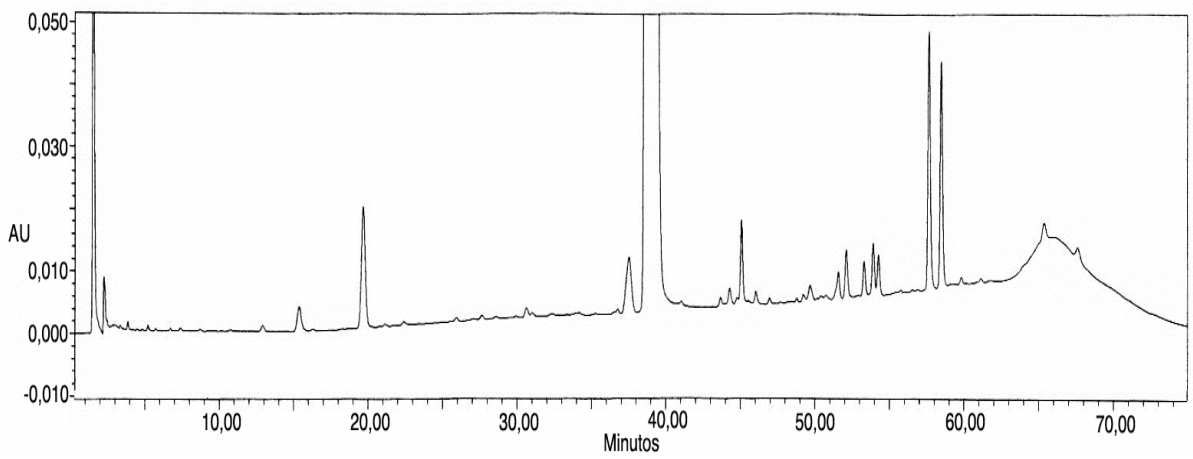


Día 9

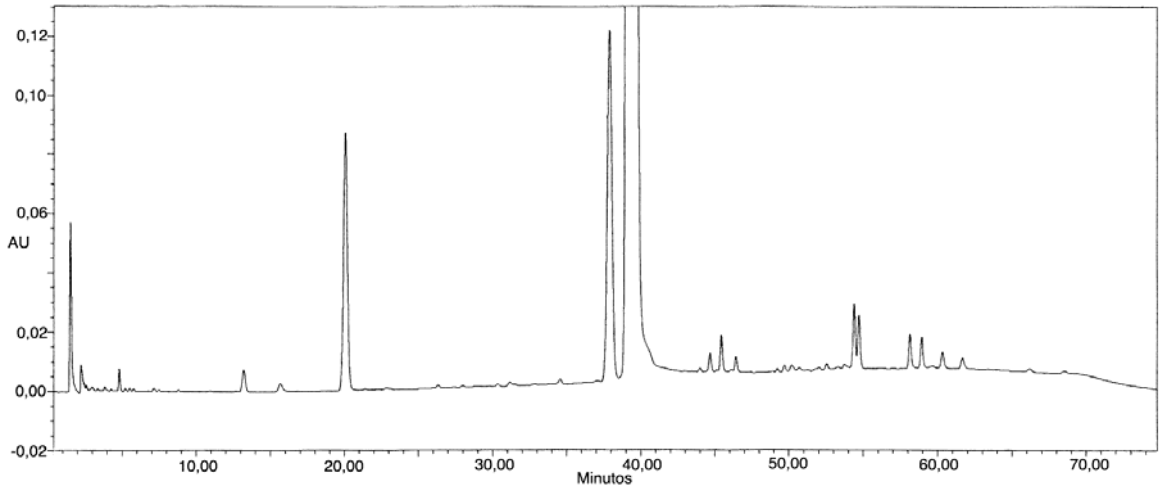


Día 21

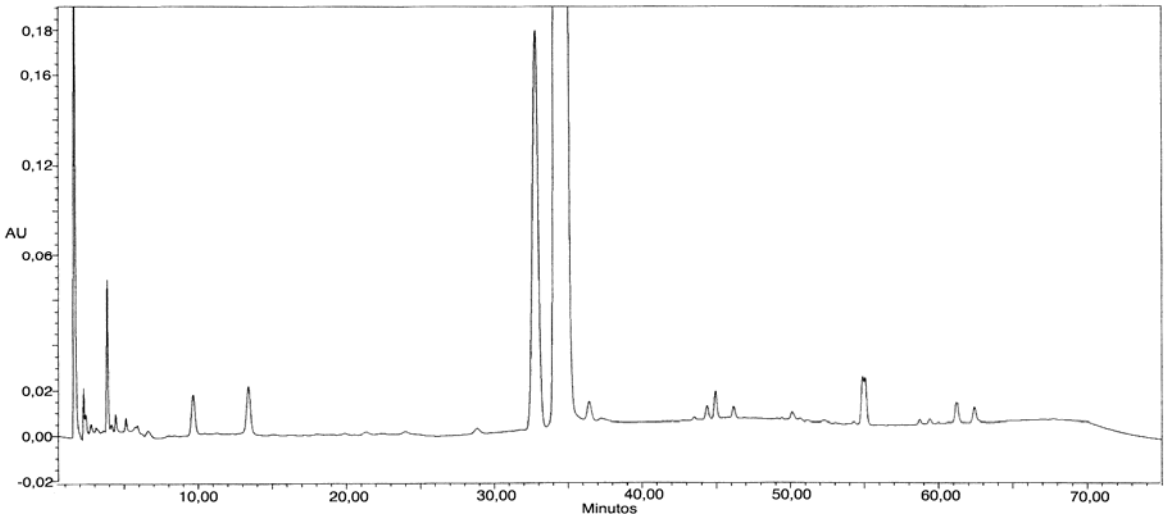
Figura 25. Cromatograma del Sistemas antocianina:ácido vainíllico 1:2 a 510 nm.



Día 0

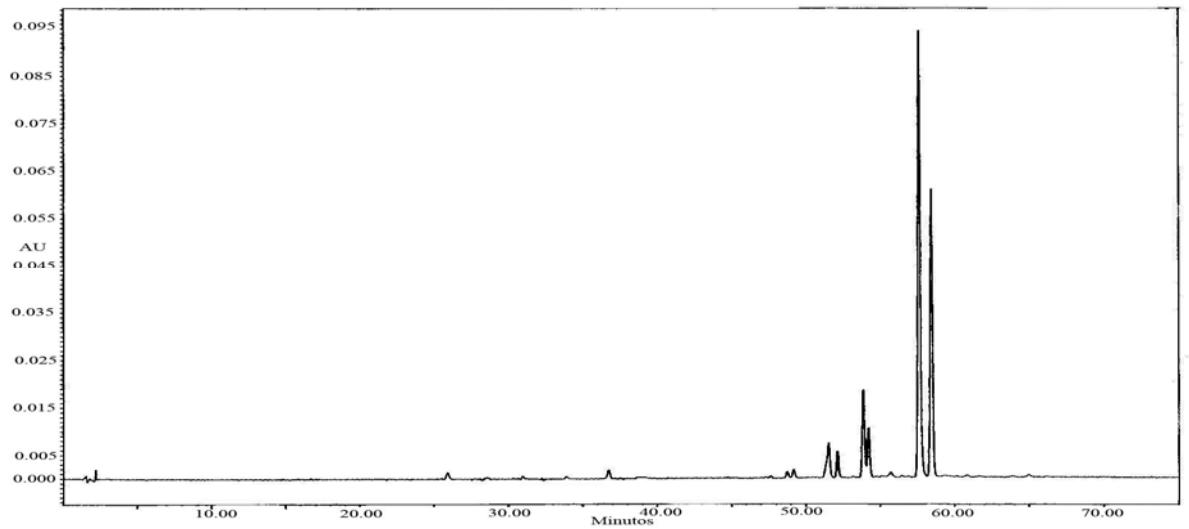


Día 9

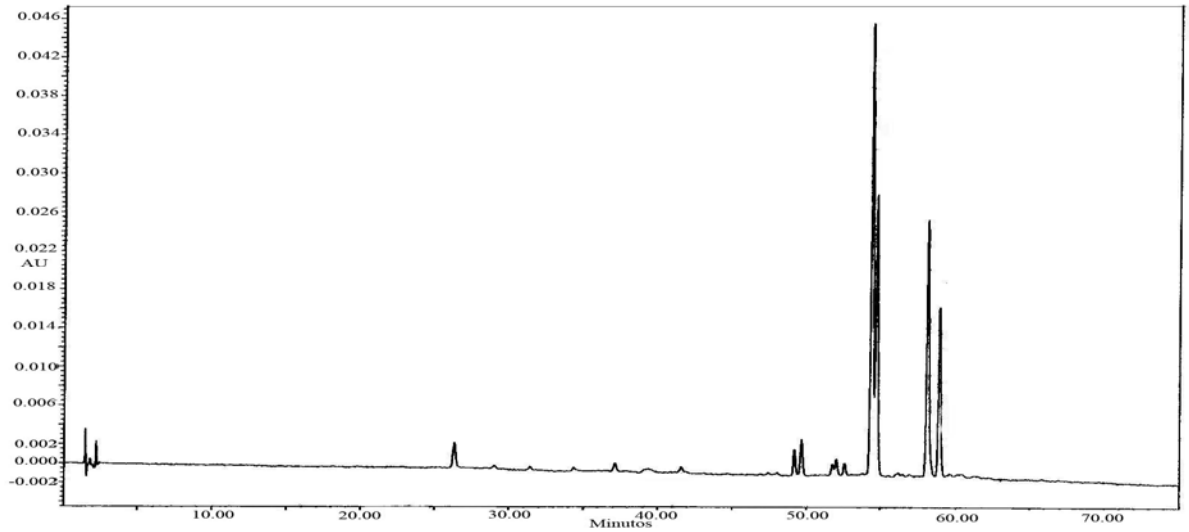


Día 21

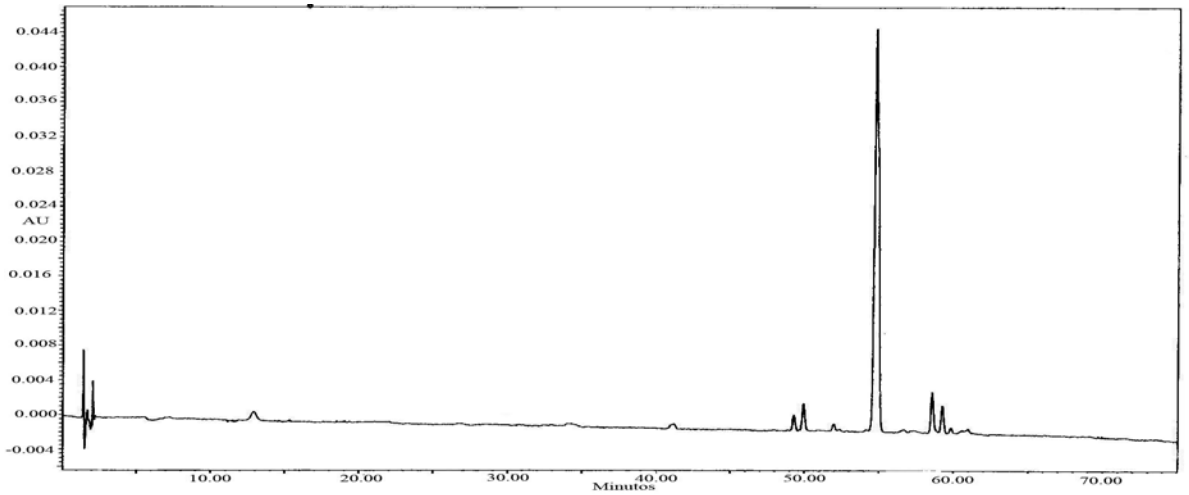
Figura 26. Cromatograma del Sistemas antocianina:ácido vainíllico 1:0.5 a 254 nm.



Día 0



Día 9



Día 21

Figura 27. Cromatograma del Sistemas antocianina:ácido vainíllico 1:0.5 a 510 nm.

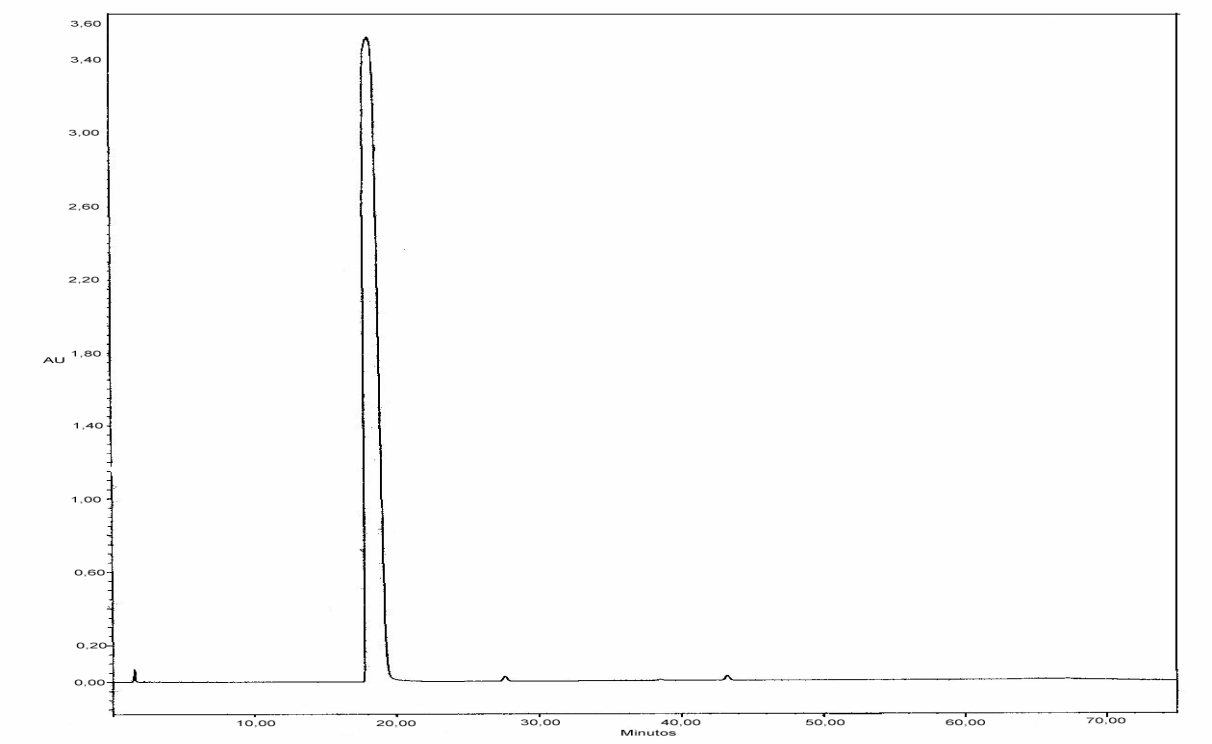


Figura 28 Cromatograma del ácido vainíllico a 254 nm.

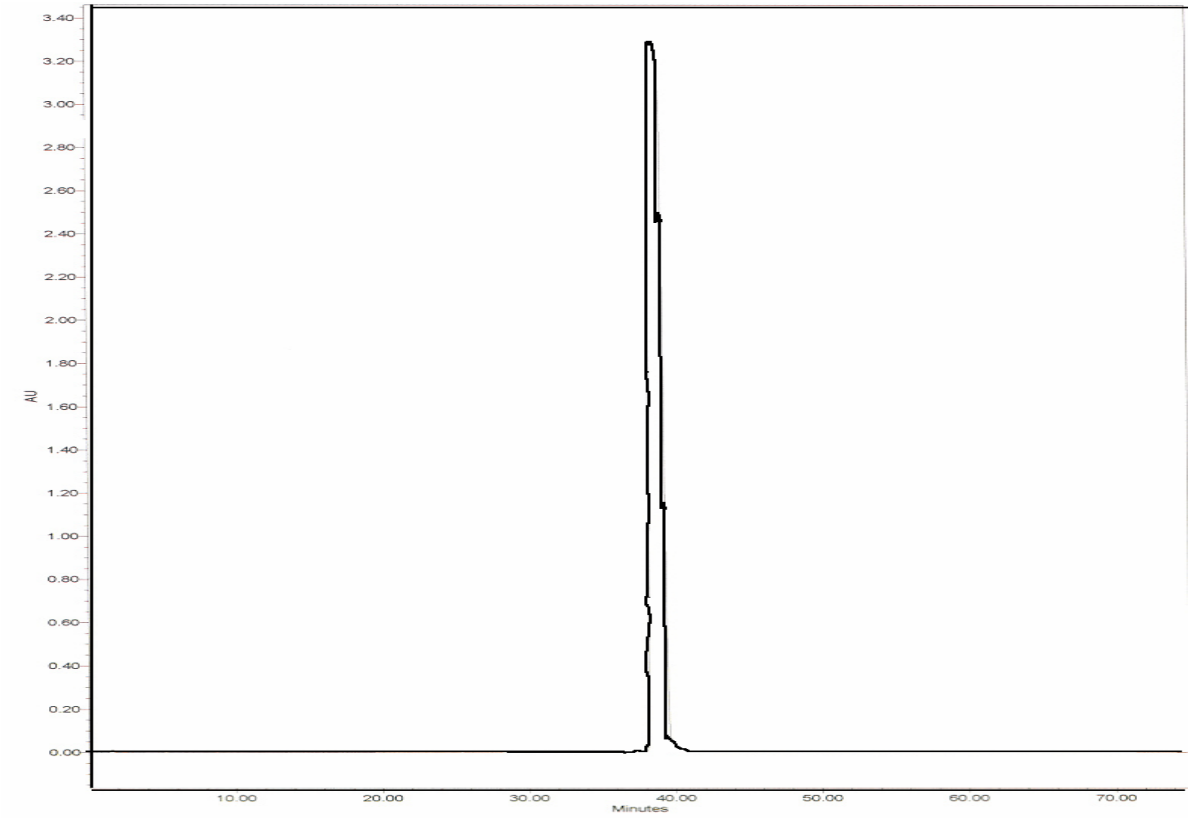


Figura 29. Cromatograma del sorbato de potasio a 254 nm.

7.2.7 CONCLUSIONES DE LA SEGUNDA FASE

Tanto los Sistemas como el Control muestran un comportamiento similar con una tendencia hacia una disminución del ángulo (Tono), lo que indica que hay un cambio de tono rojo-anaranjado a un anaranjado según la escala de Hunter (Francis and Clydesdale, 1975). El Sistema antocianina : ácido vainíllico 1:1 tuvo un ligero aumento en la Pureza que puede ser debido a la copigmentación, mientras que los demás Sistemas y el Control muestran un comportamiento más uniforme. En cuanto a la Diferencia Neta de Color se observa a los Sistemas y al Control con un comportamiento uniforme hasta los 23 días, posteriormente se observa un mayor cambio en el Control con respecto a los Sistemas. Los Sistemas y el Control muestran un aumento en Luminosidad uniforme hasta los 14 días. A partir de esa fecha la Luminosidad disminuye más en el Sistema antocianina : ácido vainíllico 1:1. Tanto los Sistemas como el Control muestran una disminución en la concentración de antocianina, probablemente por la degradación del pigmento. El Sistema antocianina : ácido vainíllico 1:1 muestra un ligero incremento en la concentración al final del experimento. La Pureza y la Luminosidad del Sistema antocianina : ácido vainíllico 1:1 fue mayor a la de los demás Sistemas, por lo que lo convierte un buen candidato para la segunda fase de la investigación.

En los cromatogramas se identifican a las pelargonidina-3-soforósido-5-glucósido con diferentes tipos de acilación, así como a sus agliconas.