

ANTOCIANINAS EN UVAS var. NIABELL

Resumen del trabajo presentado por SALOMÓN FERREIRA A., para optar al título de Master en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de California, Davis, Cal.

Presidente de Tesis: doctor B. LUH.

INTRODUCCION

Los colores en la naturaleza y particularmente en los alimentos son muy importantes para el hombre desde muchos puntos de vista. Entre todos esos colorantes vegetales, las antocianinas son responsables por toda una gama de colores que van desde el rojo, el azul, el anaranjado y el púrpura hasta el violeta.

La preservación del color natural en los alimentos es factor de calidad y tiene gran influencia en la aceptación que les brinda el consumidor. Cuando los alimentos se manejan y almacenan en malas condiciones, el color puede sufrir cambios indeseables que pueden estar íntimamente relacionados con cambios desfavorables en la calidad.

El concentrado de uva roja con sabor neutro se usa ampliamente en la industria de alimentos como fuente de color.

Las antocianinas son uno de los principales constituyentes fenólicos presentes en el vino rojo. Ellos contribuyen a la calidad del vino en lo referente a brillo y astringencia. Por otro lado las uvas altamente coloreadas rara vez producen vinos de calidad aceptable. (Chen & Luh, 1965).

El conocimiento de la naturaleza de los pigmentos responsables de su color es de especial importancia para los genetistas, botánicos, etc., que tratan de desarrollar nuevas variedades de uvas con color de mejores características. También es importante para todos aquellos que utilizan las uvas como materia prima en la fabricación de alimentos. (Rankine et al., 1958).

Este trabajo estudia algunas de las propiedades de las antocianinas presentes en las uvas var. Niabell con el objeto de relacionar estas propiedades para tratar de establecer su identidad.

El estudio completo incluye aislamiento y purificación de las diferentes antocianinas por medio de intercambio iónico y cromatografía en papel, identificación de los pigmentos basados en sus valores R_f , el análisis de los productos resultantes de la hidrólisis ácida y de sus propiedades de absorción en el espectro visible y la región ultra-violeta.

REVISION BIBLIOGRAFICA

Entre los investigadores que han centrado su atención sobre la estructura básica de las antocianinas figuran Hayashi (1962), Robinson y Col. (1932), Abe y Hayashi (1956), Bate-Smith (1948) y Harborne (1958 a y b).

Numerosos investigadores han dirigido su atención hacia las antocianinas de las uvas. Entre ellos figuran: Albach, Kepner y Webb (1963, 1965), Somaatmadja y Powers (1963), Akiyoshi, Webb y Kepner (1963), Smith y Luh (1966) y Carreño y Luh (1967).

Otros han centrado su atención en las antocianinas de otros productos vegetales como cerezas, frambuesas, cebolla cabezona, ruibarbo, etc. Entre ellos figuran: Daravingas y Cain (1965), Lynn y Luh (1964), Hsia, Luh y Chichester (1965), Bonnie y Francis (1967), Elbe y Schaller (1968), Wrolstad y Heatherbell (1968), Fuleki y Francis (1968), Co y Markakis (1968), Elbe, Bixby y Moore (1969), Wrolstad y Putman (1969).

MATERIALES

1. Uvas.

Las uvas de la var. Niabell fueron cosechadas en el huerto de la Universidad de California (Davis) de árboles de 12 años de edad. Fueron procesadas convenientemente y envasadas en envases metálicos N° 2½ y almacenadas a — 23° C.

El análisis de las uvas dio: (Olmo y Koyama, 1962).

Sólidos solubles: 20.2%.

Acidez total (como ácido tartárico) 0.47%

pH 4.22.

La fruta es muy coloreada, grande, muy palatable y forma racimos grandes.

2. Solventes de elución y extracción.

Acido clorhídrico en metanol absoluto al 0.1%, 0.2% y 0.5% (p/v) de ácido, para la extracción.

Acido clorhídrico en metanol absoluto al 0.01% (p/v) de ácido como solvente para los espectros de absorción.

3. *Papel y cámaras para cromatografía.*

Se utilizó papel Whatman 3 M M para aislamiento y purificación de las antocianinas y papel Whatman Nº 1 para las determinaciones de los valores R_f, análisis de ácidos, azúcares y productos de hidrólisis.

4. *Solventes.*

Los solventes utilizados para los diferentes fines, están detallados en la tabla I.

5. *Reactivos cromogénicos.*

Para la identificación de los azúcares se utilizó un reactivo preparado con anilina, ácido ftálico y n-butanol saturado con agua (Partridge 1958). Para la identificación de los compuestos fenólicos resultantes de la hidrólisis ácida de las antocianinas se utilizó la p-nitroanilina diazotada DPNA. Este reactivo requiere condiciones especiales de preparación y uso.

6. *Patrones de compuestos fenólicos.*

Se utilizaron soluciones de ácidos caféico, p-cumárico, ferúlico y clorogénico en éter etílico para identificación de los ácidos orgánicos. En los estudios de los productos de degradación alcalina se utilizaron soluciones de ácidos siríngico, vanílico y gálico, 3-0-metilgálico y p-hidroxibenzoico y de floroglucinol en éter etílico.

7. *Patrones de azúcares.*

Se utilizaron soluciones acuosas de glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa, ramnosa y maltosa.

8. *Resinas de intercambio iónico.*

Para la separación masiva de las antocianinas se utilizó la resina catiónica Dowex 50 W X 4 malla 100-200 (J. T. Baker Chemical Co., Phillisburg, N. J.). Estas resinas fueron convenientemente activadas y purificadas.

Para la remoción de los iones cloruro en la separación de los azúcares y los aglicones se utilizó la resina aniónica Dowex 1 X 8 malla 100-200. La resina en su forma de acetato fue preparada de acuerdo al método descrito por El Khidir (1969).

T A B L A I

Solventes utilizados para la separación e identificación de las antocianinas.

Abreviatura	Descripción de la composición	Relación v/v	Capa utilizada	Compuesto detectado	Tiempo de recorrido (Hr.)
BAW ¹	(1) n-butanol: ácido acético: Agua	4: 1:5	Superior	Antocianinas	18 (Rf.)
				Azúcares	18 (Rf.)
				Azúcares	36 (Rf.)
				Acidos	18 (Rf.)
AWH	(2) ácido acético: Agua: A. Clor. 12 N.	15:82:3	miscible	Antocianinas	12 (Separ)
				Antocianinas	5.5 (Rf.)
2% HoAC	(3) Acido acético: Agua	2:93	miscible	Acidos	4 (Rf.)
Eth: HoAC: H ₂ O	(4) ² Acetato de etilo: ácido acético: Agua	3: 1:3	Superior	Azúcares	15 (Rg.)

¹ BAW para la separación e identificación se dejó equilibrar por lo menos 3 días antes de usarlo (Bate-Smith 1948).² El solvente se dejó equilibrar durante 12 horas antes de usarlo.

9. *Espectrofotómetro.*

Los espectros de absorción de los pigmentos purificados y su comportamiento frente a la solución de cloruro férrico fueron tomados en un espectrofotómetro Beckman DK-2 con registrador y en un espectrofotómetro Beckman D-U.

MÉTODOS

1º El proceso de extracción de las antocianinas es básicamente el mismo descrito por Chen y Luh (1965). El solvente utilizado fue metanol con 0.1% (p/v) de ácido clorhídrico, con concentraciones crecientes de ácido hasta 0.5% (p/v). La purificación del extracto se hizo con resina de intercambio iónico. Se puso atención especial a la elución, manejo y almacenamiento del extracto. El líquido purificado y concentrado se denominó "extracto crudo".

2º *Separación de los pigmentos.*

La separación primaria se hizo por cromatografía en papel con los solventes 1 y 2, elución y concentración de los líquidos de elución a presión reducida.

Los diferentes colorantes se nombraron con números arábigos: 1, 2, 3, etc., de acuerdo a su orden de aparición con relación a la línea de origen del cromatograma desarrollado con el solvente 1, siendo el colorante 1 el más próximo al origen. Los colorantes se nombraron luego con letras de acuerdo a su orden de aparición en relación con la línea de origen en los cromatogramas desarrollados con el solvente 2, siendo el colorante 2a el más próximo a la línea de origen del concentrado del producto de elución del colorante de la banda 2.

3º *Cromatografía bidimensional.*

Se hizo con el extracto crudo, para determinar el número de compuestos y su posición relativa en el cromatograma. Se utilizaron solvente 1, (18 hr.) y solvente 2 (12 hr.) en dirección descendente.

4º *Hidrólisis ácida.*

Se hizo de acuerdo al método descrito por Abe y Hayashi (1956) para cada uno de los pigmentos aislados y para el extracto crudo.

5º *Grupos ácidos en la antocianina.*

El análisis de los ácidos en las antocianinas se hizo por cromatografía a partir del extracto etéreo concentrado proveniente de la

extracción de los ácidos presentes en el líquido de hidrólisis ácida con este solvente. Los cromatogramas se desarrollaron con solvente 1 (18 hr.) y con solvente 3 (4 hr.) en dirección descendente, junto con patrones de ácidos caféico, p-cumárico, ferúlico y clorogénico.

La identificación se basó sobre los valores Rf y el comportamiento frente a la luz U.V., los vapores de amoníaco y la solución de DPNA. Igual tratamiento se hizo al extracto crudo.

6º *Análisis de los carbohidratos.*

Los carbohidratos presentes se extrajeron de la porción acuosa proveniente de la hidrólisis ácida, después de tratamiento con la resina aniónica y la catiónica.

La identificación se hizo por cromatografía en papel utilizando el solvente 1 (36 hr. y 18 hr.) junto con patrones de glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa, ramnosa y maltosa. Se tomaron los valores Rf y Rg después de revelar con el reactivo de ácido ftálico y anilina.

Lo mismo se hizo para los carbohidratos presentes en el extracto crudo.

7º *Estudio de los aglicones.*

Los aglicones obtenidos por hidrólisis ácida del extracto crudo se absorbieron con resina Dowex 50 W \times 4 y se hizo elución con metanol con 0.1% (p/v) de ácido clorhídrico. El eluato se concentró a presión reducida.

8º *Degradación alcalina de los aglicones.*

Los aglicones obtenidos del extracto crudo se sometieron a hidrólisis alcalina con hidróxido de bario al 12% (p/v) a 105°C por 1 hr. Toda la operación requiere cuidadoso control de las condiciones de hidrólisis. Los productos de degradación se extrajeron con éter. El extracto etéreo concentrado se aplicó sobre papel Whatman N° 1 junto con soluciones patrones de ácidos siríngico, vanílico, gáico, 3-0-metilgálico, protocatecuico, p-hidroxibenzoico y floroglucinol.

La cromatografía y la identificación de los compuestos aromáticos se hizo de la misma manera que para los ácidos orgánicos.

9º *Cromatografía de las antocianinas.*

Los pigmentos purificados fueron colocados en papel Whatman N° 1 y desarrollados con solvente N° 1 (18 hr.) y solvente N° 2 por 5,5 hr. Se observaron bajo luz U.V. y se tomaron los valores Rf.

10. *Espectros de absorción.*

Se tomaron con un espectrofotómetro Beckman DK-2 con registrador en las regiones visible y ultra-violeta.

Los colorantes se disolvieron en metanol con 0,01% (p/v) de ácido clorhídrico. El cambio batocrómico se hizo con 3 gotas de solución de cloruro de aluminio al 5% (p/v) en alcohol etílico al 95%.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. El método de extracción y purificación de las antocianinas con la resina catiónica probó ser satisfactorio. Los pigmentos no pueden ser eluidos completamente aun con cantidades relativamente grandes de líquido (3 litros). Se evitó siempre la adición de grandes cantidades de resina debido a que los pigmentos pueden ser removidos menos eficientemente. Siempre se prefirió repetir las extracciones con el objeto de aumentar el rendimiento.

El tiempo de contacto de la resina con los pigmentos es un factor muy importante. La resina no debe dejarse en contacto con las antocianinas por más de 30 minutos. También es necesario remover bien los compuestos fenólicos y los azúcares presentes en el medio antes de eluir las antocianinas. Estos compuestos interfieren en la separación y purificación. La estabilidad de los compuestos resulta seriamente afectada por la luz, el oxígeno y los cambios de pH. Es aconsejable cubrir todos los recipientes con lámina de aluminio y remover el oxígeno atrapado por burbujeo de nitrógeno.

El solvente debe contener suficiente cantidad de HCl para asegurar la estabilidad del compuesto. Se observó mejor estabilidad del compuesto con metanol con 0.1% (p/v) que con 0.1% (v/v). El solvente se preparó agregando 3 ml. de ácido clorhídrico a suficiente cantidad de metanol para hacer 1.000 ml. de solvente.

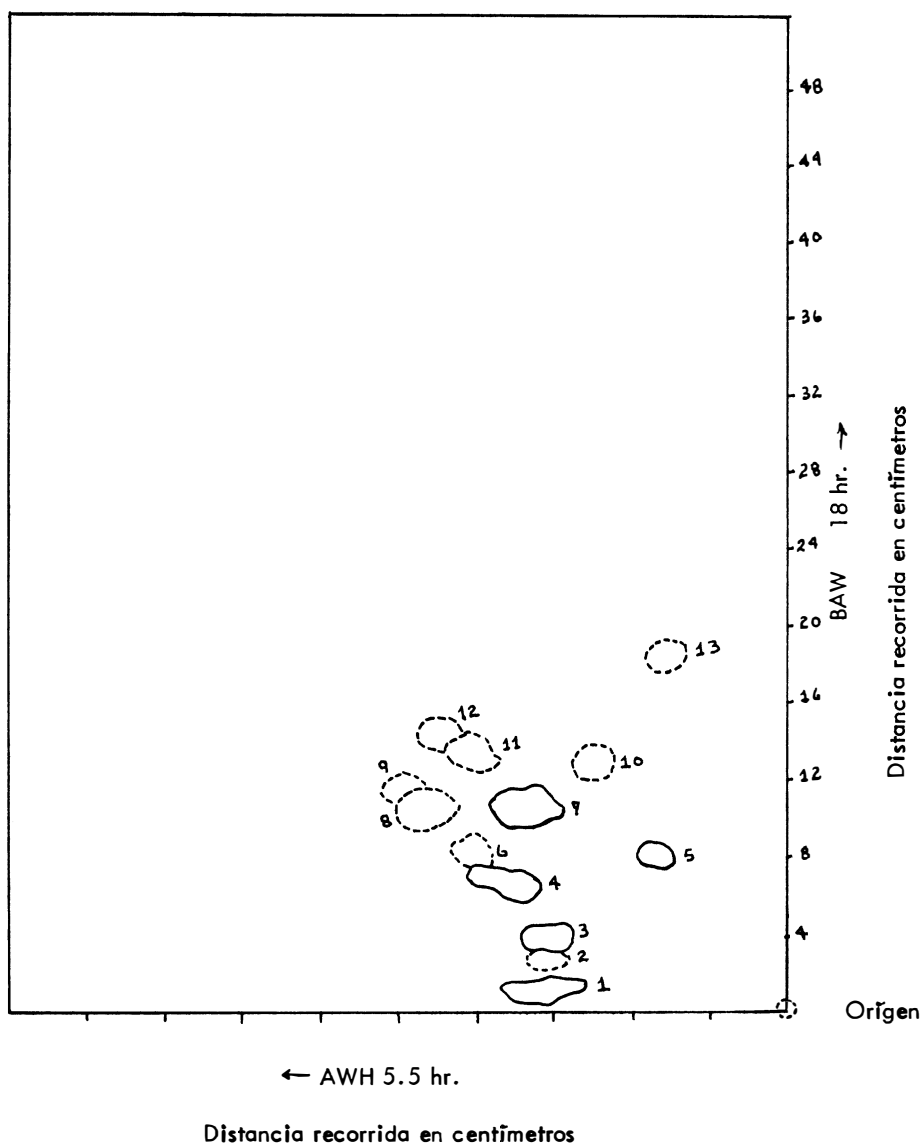
2. *Cromatografía bidimensional de las antocianinas.*

Sobre una lámina de papel Whatman 3 M M se aplicaron unos 20 μ l del extracto crudo. Se hizo el recorrido con solvente 1 (4:1:5) en la dirección más larga por 18 horas y en forma descendente y con solvente 2 (15:82:3) durante 12 horas en dirección descendente.

La figura N° 1 muestra la posición relativa de los compuestos en el cromatograma. Los pigmentos más abundantes están demarcados con líneas continuas y los menos abundantes con líneas discontinuas.

Algunos pigmentos, particularmente el pigmento N° 9 y otros pigmentos menores, no aparecieron en todos los cromatogramas.

Fig No. 1. CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DE LAS ANTOCIANINAS DE UVAS VAR. NIABELL.



Los cromatogramas bidimensionales muestran cierto grado de superposición de las manchas. La mayoría de los compuestos se localizaron en la parte inferior derecha del cromatograma. Los cambios producidos en el color de las manchas correspondientes a antocianinas, por atomización de cloruro de aluminio al 5% (p/v) en etanol, no fueron muy definidos. El cambio de color fue más aparente por adición de la solución de cloruro de aluminio al colorante disuelto en metanol con 0,01% (p/v) de ácido clorhídrico.

Los cambios producidos en el espectro de absorción por adición del reactivo de cloruro de aluminio no fueron muy aparentes.

De la cromatografía bidimensional se dedujo que el extracto crudo contenía por lo menos 13 compuestos diferentes.

Estos compuestos se nombraron con números arábigos en orden creciente con relación a la línea de aplicación en la dirección de recorrido con el solvente 1, siendo el compuesto N° 1 el más próximo al origen. Los pigmentos también fueron nombrados con números arábigos de acuerdo a su posición en relación con la línea de origen en el recorrido con el solvente 2, ej: los pigmentos Nos. 4, 5 y 6 están más o menos al mismo nivel en la primera dirección, pero el compuesto N° 5 está más próximo a la línea de origen de la segunda dirección, que los pigmentos Nos. 4 y 6, pero un poco más arriba que el pigmento N° 4. Del cromatograma bidimensional se dedujo que los pigmentos o compuestos más abundantes son los Nos. 1, 3, 4, 5 y 7.

3. Separación y purificación.

La identificación de las antocianinas depende en gran parte de la eficiencia de la separación y purificación. La obtención de compuesto purificado en cantidad suficiente para los análisis químicos, depende no solamente de su concentración relativa en las uvas sino también de sus características cromatográficas.

La separación de las antocianinas del extracto crudo utilizando cromatografía monodimensional no resultó ser efectiva ni con el solvente 1 ni con el solvente 2 por separado.

La separación con solvente 1 (18 hr.) resultó en zonas superpuestas debido a la baja movilidad de los compuestos en este solvente.

La separación con solvente 2 (12 hr.) produjo bandas más anchas con mucha superposición. La separación satisfactoria se obtuvo por combinación de los métodos utilizando solvente 1 en la dirección más larga y luego solvente 2 en la dirección corta.

En los cromatogramas desarrollados con solvente 1 las antocianinas del extracto crudo se separaron en 5 bandas. Las bandas se cortaron en piezas pequeñas y los colorantes fueron eluidos y concentrados.

Los concentrados se aplicaron sobre papel y se desarrollaron con solvente 2. Por lo general este solvente produjo bandas bien separadas. El solvente 1 produjo bandas más angostas pero con algún grado de superposición.

Se observó la presencia de más de un compuesto en cada banda, excepto en la banda N° 1 que produjo solo un compuesto.

Sobrecalentamiento durante la aplicación de las bandas o de las manchas del extracto crudo produjo polimerización de los compuestos y la movilidad se redujo casi a 0. No fue posible remover completamente las antocianinas adsorbidas en el papel, aun con grandes volúmenes de líquido y con agitación. En este caso se obtuvo mayor rendimiento pero la celulosa en polvo fino proveniente del papel causó interferencia durante la identificación, especialmente al tomar los espectros. La celulosa debe eliminarse y, aunque difícil, puede lograrse en proporción muy aceptable por filtraciones sucesivas.

La separación de las antocianinas presentes en el extracto crudo, utilizando solvente 1 (4:1:5) produjo 5 bandas bastante diferenciadas.

La tabla II muestra las principales características de estas bandas.

TABLA II

Banda N°	Características de las bandas
1	Color púrpura-azulado. Está bien condensada y separada de la banda N° 2. No muestra fluorescencia bajo luz U.V. pero exhibe un color púrpura opaco. Aparece a aproximadamente 4.5 cm. del origen.
2	Color púrpura-azulado. Es más ancha que la anterior y muestra 2 concentraciones de color hacia sus extremos. No exhibe fluorescencia bajo radiación U.V. pero muestra un color púrpura opaco. Aparece a aproximadamente 8.5 cm. del origen.
3	Rosado-púrpura. Muestra alguna superposición con la banda N° 4. Muestra dos concentraciones de color hacia los extremos de la banda. La parte superior de la banda muestra fluorescencia roja bajo luz U.V. mientras que la parte inferior muestra un color azul opaco. Aparece a unos 13 cm. del origen.

Banda N°

Características de las bandas

- 4 Rosado. Es más ancha que la banda N° 3 y presenta algo de superposición con las bandas Nos. 3 y 5. La parte superior de la banda exhibe una fluorescencia roja. Aparece aproximadamente a 17 cm. de la línea de origen.
- 5 Rosado pálido. Es más ancha que la banda N° 4 y muestra considerable grado de superposición con ella. No exhibe fluorescencia bajo radiación U.V. Muestra muy baja concentración de color. Aparece a una distancia media de 20 cm. de la línea de origen.

La separación posterior de las antocianinas presentes en cada banda utilizando el solvente 2 (15:82:3) por 12 horas, produjo una sola banda a partir de la banda N° 1; 2 bandas a partir de la banda N° 2; 3 compuestos a partir de la banda N° 3, y 4 compuestos a partir de las bandas Nos. 4 y 5 respectivamente.

La dificultad para obtener cantidades suficientes de compuestos purificados para las determinaciones de los valores R_f, los espectros de absorción y las hidrólisis ácida y alcalina, aumenta a medida que aumenta el número de compuestos presentes en cada banda. La localización y demarcación de las bandas se hizo con lámpara de tungsteno y bajo luz U.V.

Los compuestos 2b, 3a, 4a, 4b y todos los compuestos presentes en la banda número 5 no pudieron aislarse en cantidades suficientes para hacer la hidrólisis ácida.

La tabla III muestra las características de color de los compuestos aislados por cromatografía en papel y el color de la banda N° 5 una vez que ellos fueron disueltos en metanol con 0.1% (p/v) de ácido clorhídrico y su apariencia bajo radiación U.V., inmediatamente después de secar los cromatogramas.

TABLA III

Pigmento N°

Características del color

- | | |
|----|--|
| 1 | Púrpura. No exhibe fluorescencia bajo radiación U.V. |
| 2a | Púrpura-rosáceo. No exhibe fluorescencia bajo radiación U.V. |
| 2b | Anaranjado-rosáceo. No exhibe fluorescencia bajo radiación U.V. |
| 3a | Anaranjado-rosáceo. No exhibe fluorescencia bajo radiación U.V. |
| 3b | Púrpura-azul opaco. No exhibe fluorescencia bajo radiación U.V. |
| 3c | Anaranjado-rosáceo. Fluorescencia roja brillante bajo radiación U.V. |
| 4a | Rosado. Ligeramente coloreado. |

- | | |
|----|---|
| 4b | Rosado-anaranjado. Ligeramente coloreado. No exhibe fluorescencia bajo radiación U.V. |
| 4c | Púrpura. Púrpura opaco bajo radiación U.V. |
| 4d | Púrpura. Fluorescencia rojo brillante bajo radiación U.V. |
- Banda N° 5 Rosado. Coloración muy débil. No exhibe fluorescencia bajo radiación U.V.

4. *Hidrólisis ácida.*

La hidrólisis ácida se hizo siguiendo la técnica de Abe y Hayashi (1956), con el objeto de determinar el número y posición de las moléculas de azúcares en la molécula de antocianina.

Los carbohidratos están unidos a los grupos hidroxilo en posición 3, 3 y 5 y muy raramente en posición 7 del anillo A de las antocianinas. Las antocianinas con el carbohidrato unido a la molécula en posición 5 exhibe fluorescencia bajo luz U.V.

Las antocianinas con el carbohidrato en posición C7 ocurren muy raramente (Harborne, 1965) y muestran zonas de absorción muy agudas y definidas en la región comprendida entre 280-290 m μ (Bonnie y Francis, 1967).

Como no se observaron zonas de absorción en esta región del espectro puede deducirse que las moléculas de carbohidrato están unidas al anillo en posición C3 y C5.

Los monoglicósidos al ser hidrolizados con ácido clorhídrico muestran en los cromatogramas dos manchas, sin ningún intermedio, cuando el cromatograma se desarrolla con solvente 2.

Los 3,5 diglicósidos producen por hidrólisis ácida dos compuestos intermedios y un total de 4 manchas (Harborne, 1958).

La unión de los ácidos a las antocianinas es más inestable que la unión con los carbohidratos y el grupo ácido está unido al residuo de carbohidrato. Por lo tanto, es posible obtener un compuesto intermedio (3 manchas) a partir de un 3-monoglicósido si éste está acilado. El producto resultante de la remoción del grupo ácido aparece antes que el aglicón en el cromatograma.

En la discusión de estos cromatogramas, las manchas se numeran en orden creciente a partir de la menos móvil. El pigmento N° 1 produjo 3 manchas después de la hidrólisis ácida. Estas corresponden al compuesto original, al intermedio y al aglicón. La mancha correspondiente al compuesto con menos movilidad es el aglicón. La mancha N° 1 presentó un color muy claro y no exhibió fluorescencia bajo radiación U.V.

La mancha N° 2 tenía una intensidad de color intermedia y no exhibió fluorescencia. El análisis posterior de los grupos ácidos presentó evidencias de la existencia de ácido p-cumárico. Por lo tanto, puede deducirse que el compuesto N° 1 puede ser un 3-monoglicósido acilado con ácido p-cumárico.

El compuesto 2a no muestra ningún compuesto intermedio producido por hidrólisis ácida. Ninguna de las manchas muestra fluorescencia bajo radiación U.V. Con base en los espectros de absorción y el análisis de los grupos ácidos puede considerarse que corresponde a un 3-monoglicósido. El pigmento 3b produjo 5 manchas. Solo la mancha N° 1 exhibió fluorescencia bajo radiación U.V. Con base en sus características de absorción puede considerarse como un 3,5 diglicósido acilado con ácido p-cumárico. El pigmento 3c produjo 5 manchas (3 intermedios). Aunque todas las manchas exhiben una fluorescencia rojo brillante con base en sus propiedades de absorción y el análisis de los grupos ácidos, puede ser considerado como un 3, diglicósido acilado con ácido p-cumárico.

La hidrólisis ácida del pigmento 4c produjo 3 compuestos. Las manchas exhiben alguna fluorescencia rojo brillante. De acuerdo con sus propiedades de absorción y el análisis de los grupos ácidos el compuesto puede considerarse como un 3-monoglucósido acilado con ácido p-cumárico.

Los otros compuestos no pudieron ser aislados en cantidades suficientes para someterlos a hidrólisis ácida.

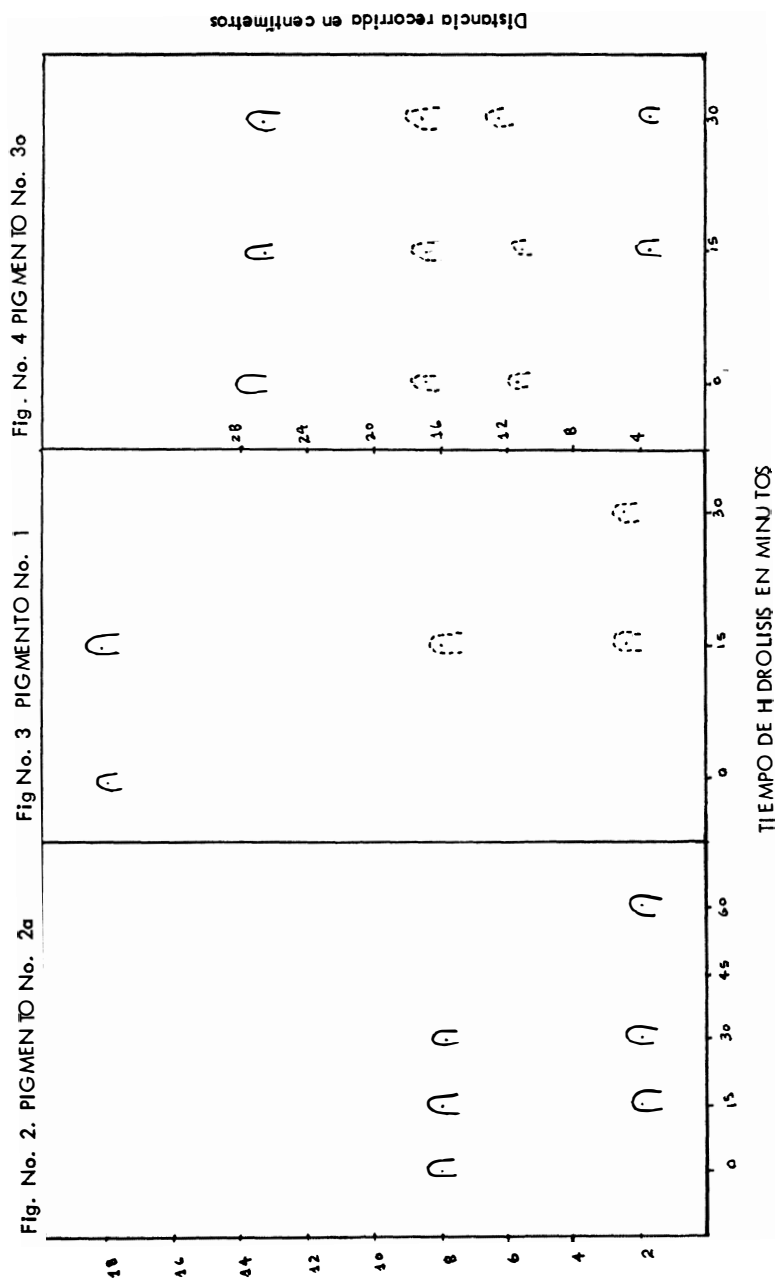
Las Figs. N° 2 a N° 6 representan los patrones de separación de los compuestos obtenidos por hidrólisis ácida, al ser analizados por cromatografía en papel utilizando el solvente 2, con un recorrido durante 12 horas.

5. *Características cromatográficas y de absorción de las antocianinas.*

La tabla IV presenta los valores R_f de 10 antocianinas purificadas. Los cromatogramas se desarrollaron con solvente 1 por 18 hr. y con solvente 2 por 5.5 en dirección descendente.

El solvente 1 para esta determinación se dejó equilibrar por 3 días antes de ser usado.

HIDROLISIS ACIDA



HIDROLISIS ACIDA

Fig. No. 5 PIGMENTO 3b

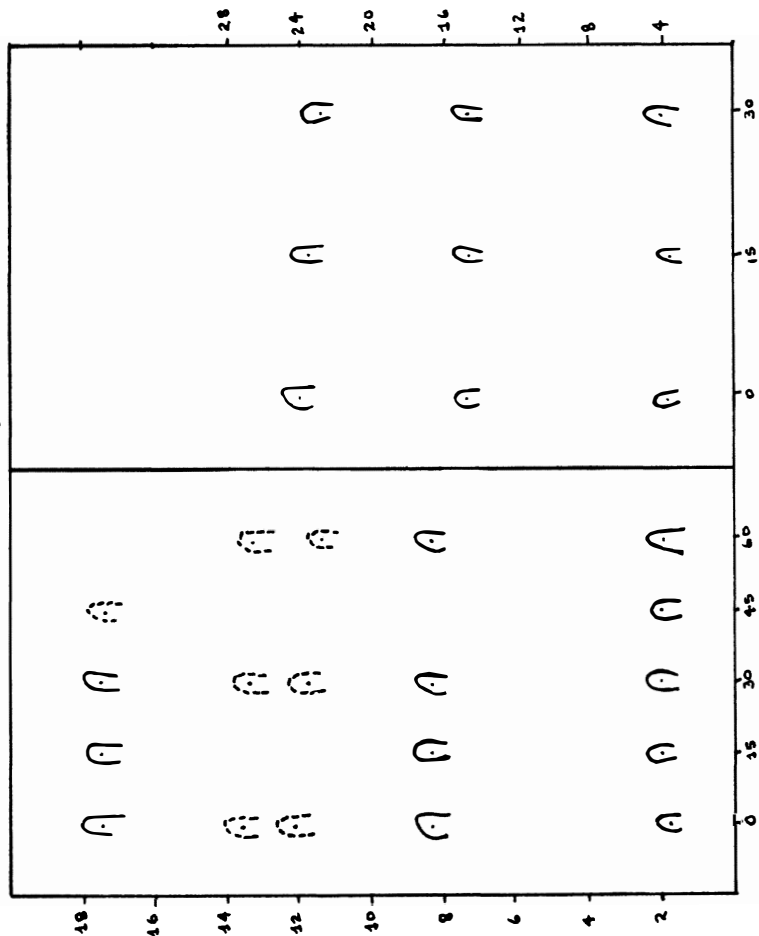


Fig. No. 6 PIGMENTO 4c

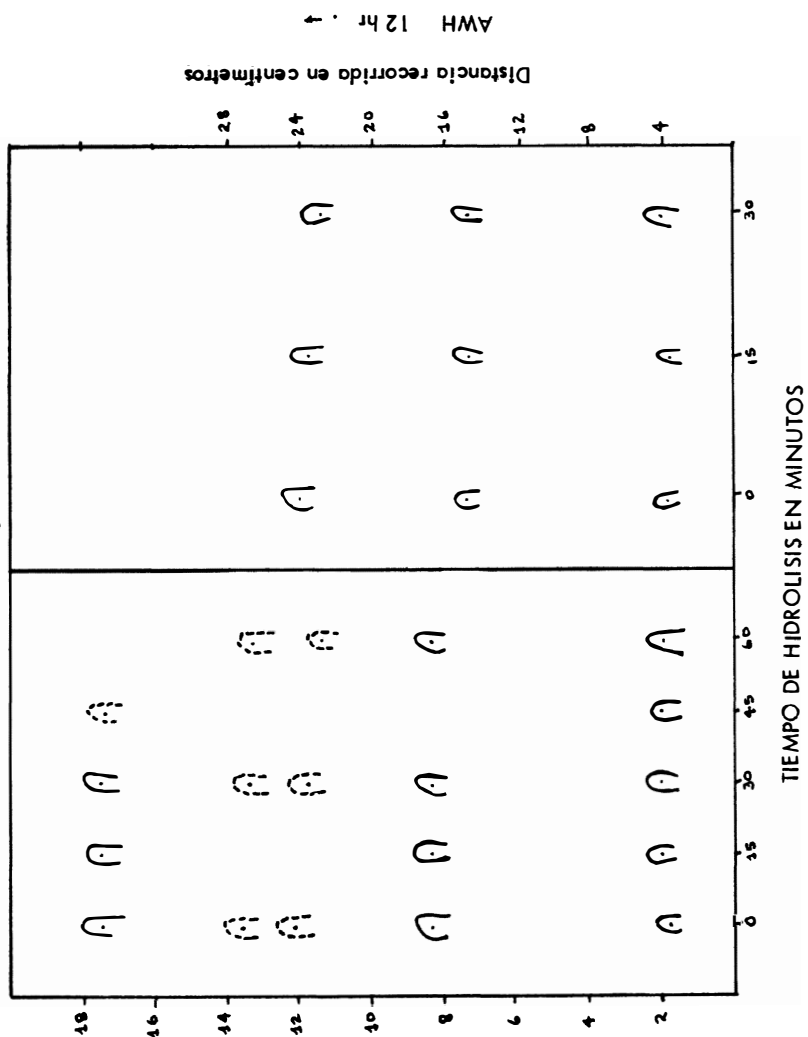


TABLA IV

Valores Rf. de las antocianinas presentes en uvas var. Niabell

Pigmento Nº	Solvente 1 (18 hr.) Descendente	Solvente 2 (5.5 hr.) Descendente
1	0.035	0.27
2a	0.09	0.16
2b	0.07	0.39
3a	0.09	0.15
3b	0.14	0.29
3c	0.15	0.34
4a	0.21	0.12
4b	0.17	0.21
4c	0.15	0.31
4d	0.20	0.38

La tabla V presenta las longitudes de onda de máxima absorción, de las antocianinas presentes en uvas var. Niabell. Los espectros corresponden a la región visible y a la U.V. Ninguno de estos compuestos muestra "picos" de absorción en la región U.V. Sin embargo el análisis de los grupos ácidos mostró evidencias de la existencia de un compuesto ácido de naturaleza muy parecida a la del ácido p-cumárico.

La tabla V muestra la relación entre la densidad óptica D.O. en el punto de máxima absorbancia y la D.O. a 440 m μ expresada como porcentaje y además el efecto causado por adición de 3 gotas del reactivo de cloruro de aluminio al 5% (p/v) en etanol, sobre la solución de la antocianina purificada.

TABLA V

Características de absorción de las antocianinas presentes
en uvas var. Niabell.

Pigmento N°	Long. onda de max. absorb. m_{μ}	$\frac{\text{O. D. 440}}{\text{O. D. max.}} \times 100$		Reacción con $AlCl_3$
1	532	17		—
2a	533	18		+ 3 m_{μ}
2b	523	23		—
3a	521	44		—
3b	533	40		+ 4.6 m_{μ}
3c	529	63		—
4a	525	13.4		—
4b	525	27.3		—
4c	534	25		—
4d	514	14		+ 4 m_{μ}
5a	530	51		— — —
5b	520	80 *		— — —
5c	518	100 *		— — —
5d	520	83 *		— — —

* Se considera muy alta debido probablemente a la falta de suficiente compuesto puro.

— No presenta cambios en el espectro.

— — — No pudo determinarse por falta de cantidad apropiada del compuesto purificado.

Las siguientes figuras corresponden a los espectros de absorción de los compuestos Nos. 1, 2a, 3b, 4c y 4d. Ellos representan el comportamiento de los compuestos analizados.

Fig. No. 7 ESPECTRO DE ABSORCION DEL PIGMENTO No. 1.

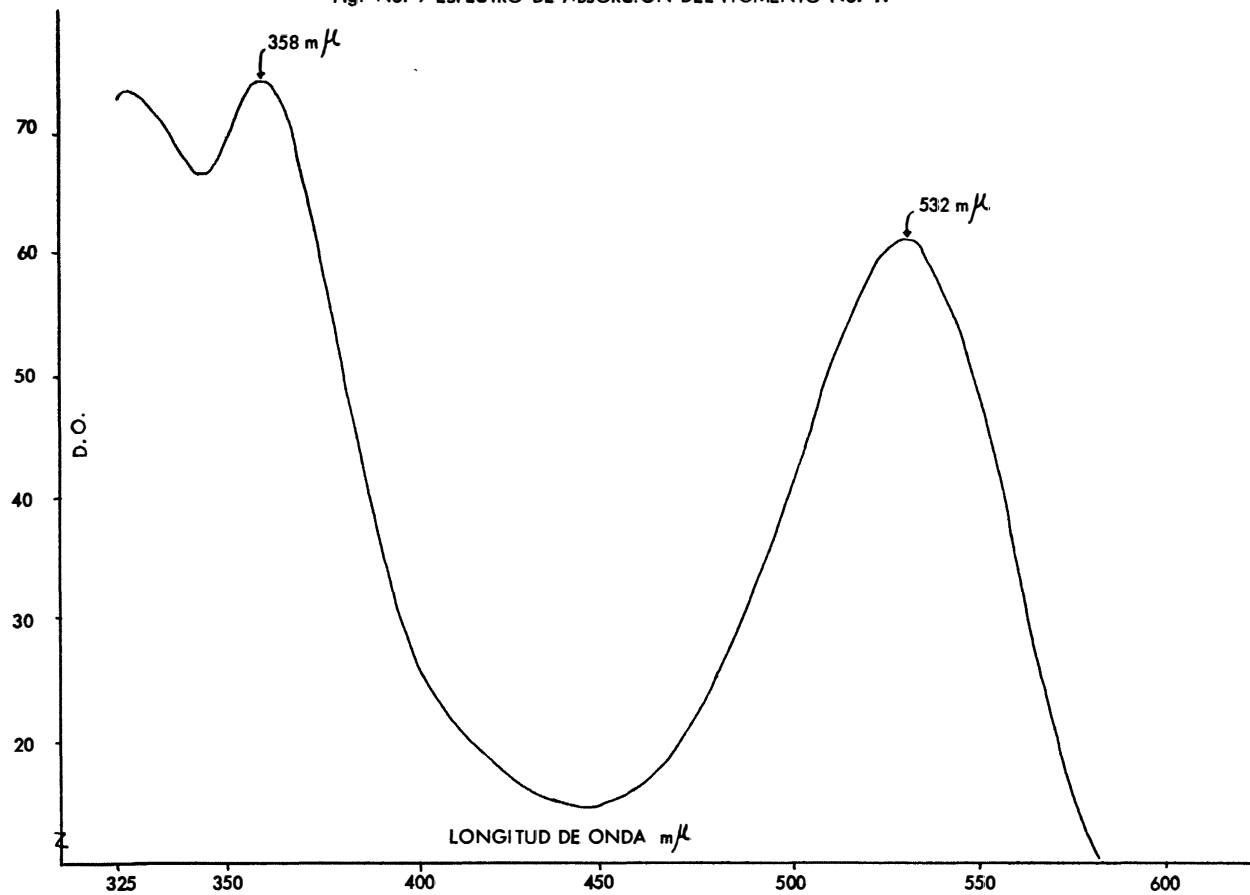


Fig. No. 8 ESPECTRO DE ABSORCION DEL PIGMENTO No 2a

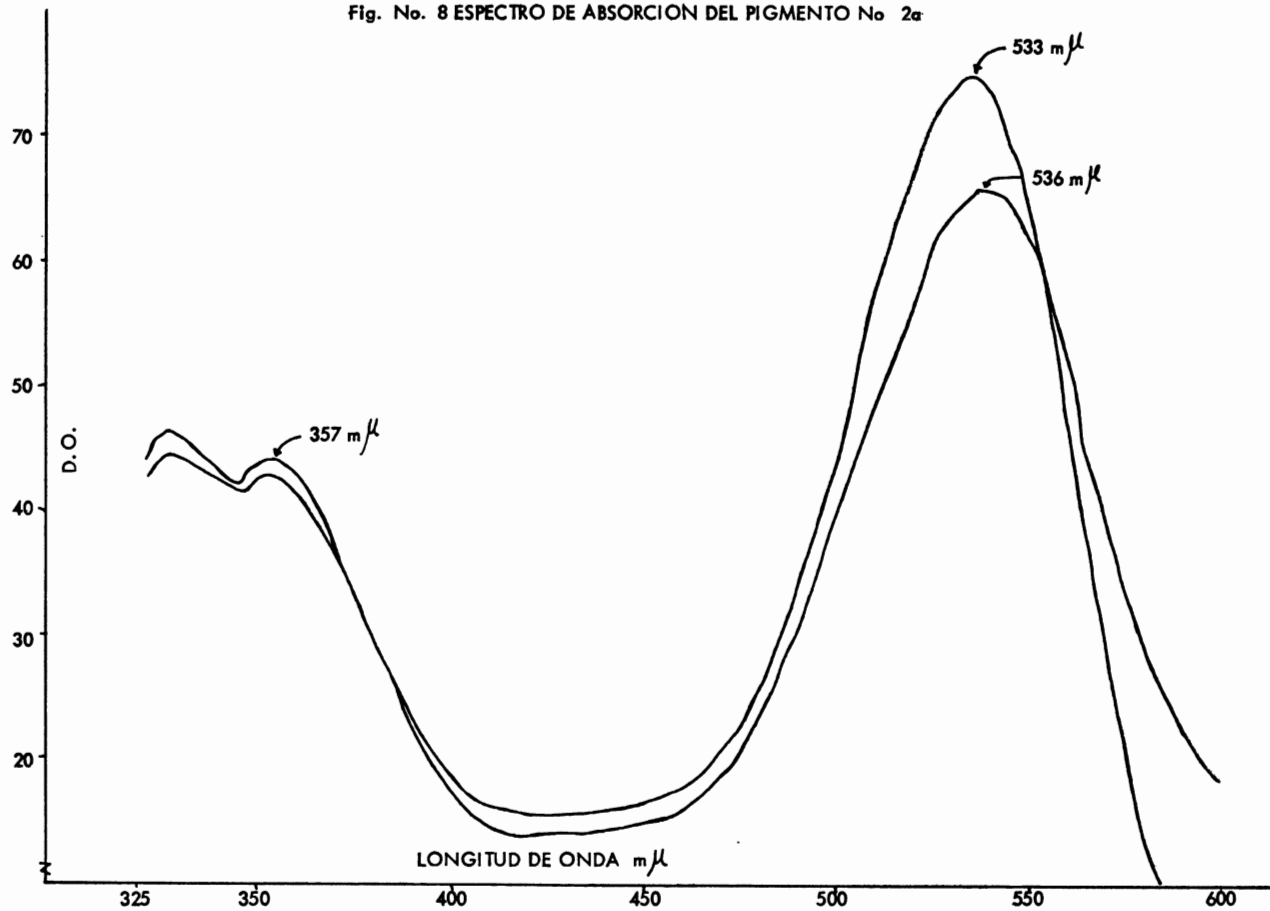


FIGURA No. 9 — ESPECTRO DE ABSORCION DEL PIGMENTO No. 3b

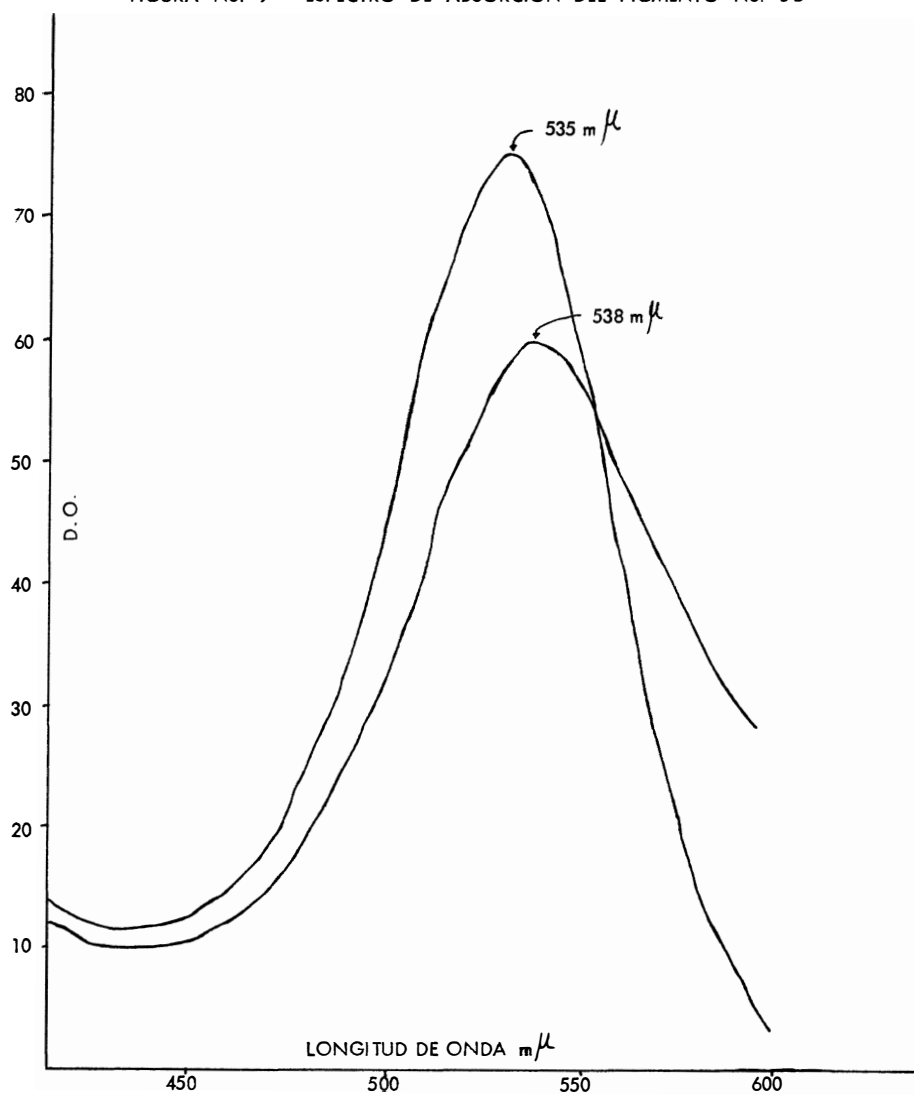
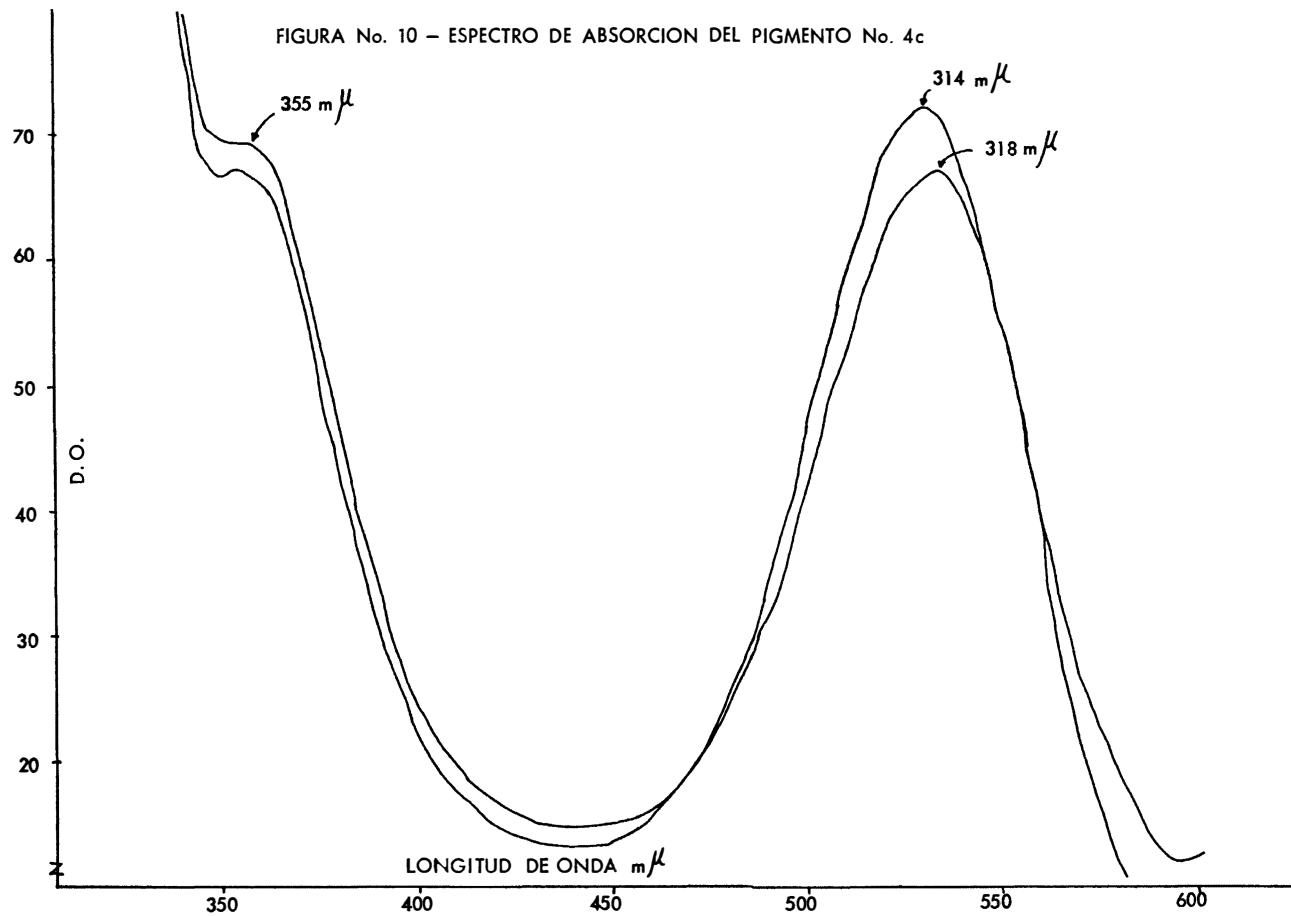
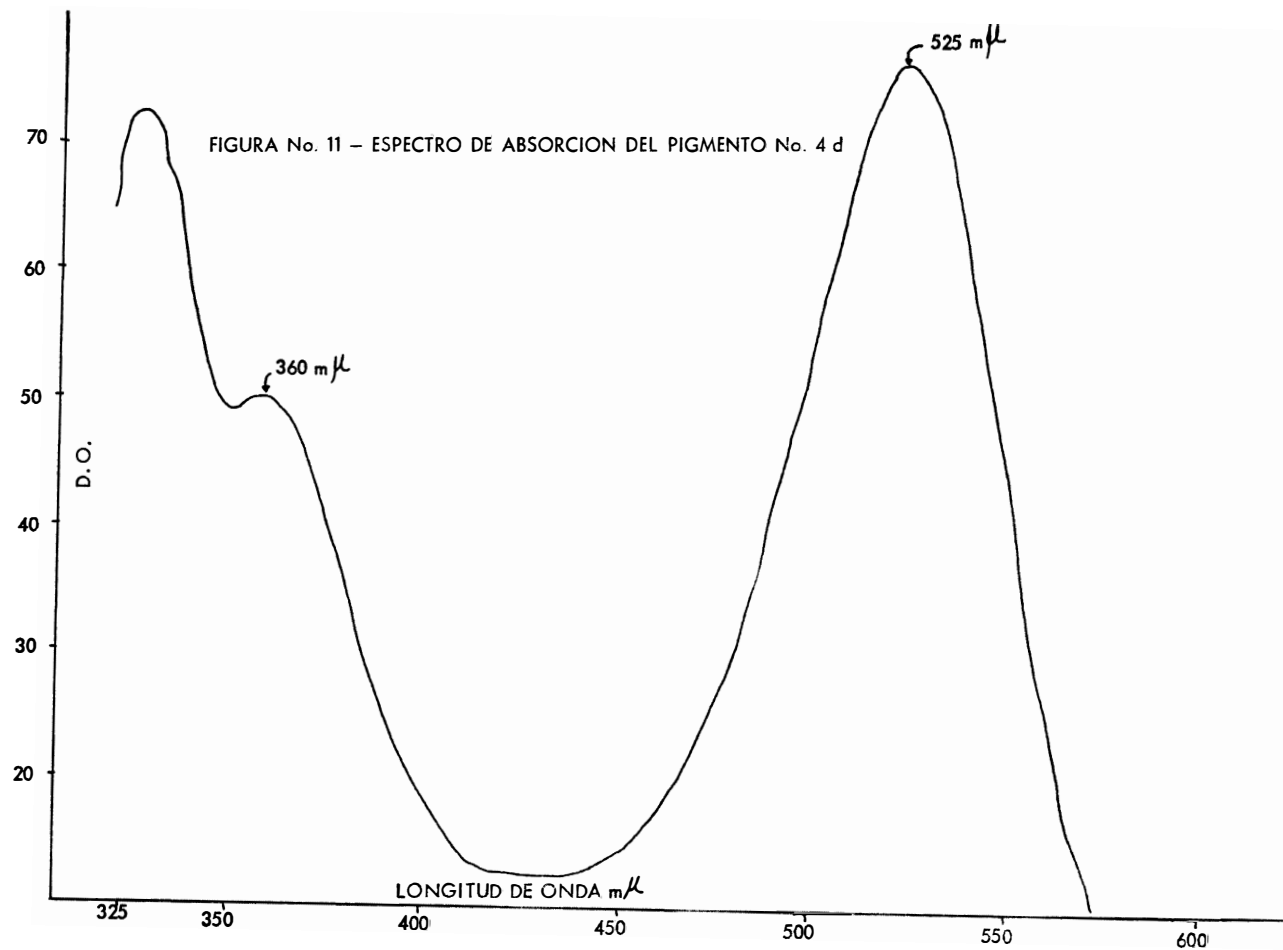


FIGURA No. 10 — ESPECTRO DE ABSORCION DEL PIGMENTO No. 4c





La mayoría de los pigmentos presenta máxima absorbancia entre 520-530 $m\mu$ y sólo 2 de ellos presentan máxima absorbancia entre 514-520 $m\mu$. Los cambios en la longitud de onda de máxima absorbancia causados por adición del reactivo de cloruro de aluminio fueron muy pequeños, aunque el cambio de color generalmente hacia un color azul claro o violeta, era bastante aparente.

El espectro del pigmento N° 1 presentó un máximo de absorbancia entre 358-362 $m\mu$ cuando el espectro se determinó con algunas concentraciones variables. Cuando la concentración del compuesto se aumentó ese máximo de absorbancia no apareció en el espectro. No se encontró una explicación satisfactoria de este fenómeno.

Jurd (1962) dijo que la adición de unas pocas gotas del reactivo de cloruro de aluminio produce un cambio batocrómico de la banda de máxima absorbancia, usualmente de 15-20 $m\mu$ para las antocianinas con grupos hidroxilo en posición orto en relación a otro grupo hidroxilo en el anillo B de la antocianina. El mismo autor establece que de acuerdo a Harborne las antocianinas con la posición C₅ insubstituída presenta "hombros" en la región comprendida entre las 410 y las 450 $m\mu$.

En el presente caso los cambios en el espectro fueron muy pequeños y se consideraron como negativos para los procesos de identificación.

6. Grupos ácidos en las antocianinas.

La tabla VI presenta los resultados del análisis de los grupos ácidos presentes en cada antocianina. La apariencia de las manchas antes y después de la exposición a los vapores de amoníaco y el color obtenido con DPNA, se utilizaron en la identificación.

Se observó que las soluciones etéreas que demostraron contener ácido p-cumárico, presentaban color amarillo mientras que las que no lo contenían aparecían transparentes. Los resultados obtenidos en los análisis de los ácidos están de acuerdo con los resultados obtenidos en los análisis de los pigmentos purificados.

La propiedad que tiene el ácido p-cumárico de no exhibir fluorescencia bajo radiación U.V. antes de la exposición a vapores de amoníaco y de exhibir fluorescencia después de sufrir la exposición, así como el color anaranjado obtenido por atomización del reactivo DPNA, son muy útiles en la identificación.

T A B L A V I
Acidos presentes en antocianinas de uvas var. Niabell

Pigmento N°	Valores Rf. a 23° C				Bajo U.V.	U.V. + NH ₃	Con DPNA	Color		Identificación
	Solvente 1 18 hr.		Solvente 3 4 hr.					DPNA + NH ₃		
1	0.87		0.43		—	fluores. azul	anaran. cla.	púrpura grisac.	p-cumárico.	
3b	0.85		0.42		—	fluores. azul	anaran. cla.	púrpura grisac.	p-cumárico.	
3c	0.86		0.43		—	fluores. azul	anaran. cla.	púrpura grisac.	p-cumárico.	
4c	0.86		0.40		—	fluores. azul	anaran. cla.	púrpura grisac.	p-cumárico.	
E.C (1)	0.86		0.42		—	fluores. azul	anaran. cla.	púrpura grisac.	p-cumárico.	
	(2)	(3)	(2)	(3)						
Caféico	0.78	0.80	0.34	0.33	Fluor. brill.	fluores. brill.	pardo claro	pardo oscuro.		
p-cumárico	0.87	0.86	0.42	0.44	—	fluores. azul	anaranjado	púrpura grisac.		
ferúlico	0.83	0.82	0.37	0.39	Fluor. brill.	fluores. brill.	rojo	púrpura grisac.		
clorogén.	0.59	0.58	0.60	0.62	Fluor. brill.	fluores. brill.	pardo claro	pardo claro.		

¹ E. C. extracto crudo.

² Valor encontrado en el análisis.

³ Valor encontrado en la literatura. (Chen & Luh, 1967).

7. Carbohidratos en las antocianinas de las uvas var. Niabell.

La tabla VII muestra los valores Rf de los carbohidratos presentes en las uvas así como de los patrones. Estos valores se obtuvieron con 2 sistemas de solventes.

Los resultados de la hidrólisis ácida con ácido clorhídrico se confirmaron por hidrólisis ácida del extracto crudo y de cada uno de los compuestos aislados y purificados, utilizando en este caso ácido acético al 10% (p/v) y realizando la hidrólisis en las mismas condiciones utilizadas en la hidrólisis ácida con ácido clorhídrico, excepto que el calentamiento duró 1.5 hr. (Chandler y Harper, 1961).

Los cromatogramas fueron desarrollados sobre papel Whatman N° 1 previamente lavado con ácido acético al 20% (p/v) con el objeto de remover las impurezas presentes en el papel y evitar así falso reconocimiento de arabinosa (Seikel, 1962; K. Venkataram, 1962; Harborne, 1958). Se observó que la aplicación excesiva de soluciones patrones de carbohidratos y de los azúcares no conocidos da como resultado la aparición de manchas amarillas adicionales parecidas a la glucosa, inclusive en el caso de pentosas, lo cual hace mucho más difícil la identificación.

Se encontró que el pigmento N° 1 contiene glucosa y que los compuestos Nos. 2a, 3b y 3c contienen arabinosa.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Las antocianinas presentes en uvas de variedad Niabell fueron extraídas con metanol al 0.1% (p/v) de ácido clorhídrico, purificadas con resina catiónica Dowex 50 W \times 4 y posteriormente fueron separadas y purificadas por cromatografía en papel. Los análisis de los productos provenientes de la hidrólisis ácida hecha con ácido mineral y ácido orgánico suministraron información sobre la naturaleza de los grupos ácidos y de los carbohidratos presentes en las antocianinas.

La posición y el número de las moléculas de carbohidrato presentes en cada antocianina fue determinada por hidrólisis ácida seguida del análisis por cromatografía en papel. Los pigmentos fueron reconocidos utilizando también sus espectros y las características de absorción. En algunos casos no pudo obtenerse información definitiva sobre la naturaleza de los compuestos debido principalmente a la dificultad de aislar suficiente cantidad de compuesto purificado.

TABLA VII
Carbohidratos presentes en las antocianinas de uvas var. Niabell.

Pigmento N°	Solvente 1		Solvente 4		Identificación
	Rf. (18 hr.)	Rg. (36 hr.)	Rg. (15 hr.)		
Hidrólisis-HCl					
1	0.14	1.00	1.03		Glucosa.
2a	0.19	1.36	1.36		Arabinosa.
3b	0.20	1.46	1.46		Arabinosa.
3c	0.20	1.46	1.32		Arabinosa.
4c	0.20	1.48	1.28		Arabinosa.
E.C.	0.13	0.98	0.98		Glucosa.
	0.20	1.46	1.36		Arabinosa.
Hidrólisis-HOAc					
2a	0.19	1.18	1.37		Arabinosa.
3b	0.19	1.18	1.36		Arabinosa.
4c	0.19	1.18	1.36		Arabinosa.
E.C. (1)	0.16	1.00	0.98		Glucosa.
	0.20	1.18	1.38		Arabinosa.
Patrones	(2)	(3)	(2)	(3)	
Glucosa	0.14	0.18	1.00	1.00	1.00
Galactosa	0.13	0.16	0.91	0.90	0.92
Arabinosa	0.20	0.21	1.39	1.17	1.36
Xilosa	0.23	0.28	1.61	1.27	1.50
Ramnosa	0.37	0.31	2.42	1.61	1.91
Maltosa	0.04	0.11	0.32	—	0.43

¹ Extracto crudo.

² Valores encontrados en los análisis.

³ Valores encontrados en la literatura. (Partridge, 1948).

La información basada en la naturaleza del glicósido, el azúcar presente en la molécula así como el análisis de los grupos ácidos y las características de absorción, indican que entre todos los pigmentos presentes están:

- Pigmento Nº 1 Malvidina 3 - monoglucósido acilada con ácido p - cumárico.
Pigmento Nº 2a Malvidina 3 - monoarabinósido.
Pigmento Nº 3b Malvidina 3,5 - diarabinósido acilada con ácido p - cumárico.
Pigmento Nº 3c Peonidina 3 - diarabinósido acilada con ácido p - cumárico.
Pigmento Nº 4c Malvidina 3 - monoarabinósido acilada con ácido p - cumárico.

El pigmento Nº 2b puede ser considerado como el 3-monoglucósido del tipo de la peonidina y el pigmento Nº 4a puede ser considerado como el 3,5 diglicósido posiblemente del tipo de la peonidina.

RESUMEN

Las antocianinas de las uvas var. Niabell se aislaron y purificaron por cromatografía en papel. Los pigmentos purificados fueron sometidos a hidrólisis ácida. La identificación de los pigmentos purificados se basó en los datos provenientes de la hidrólisis ácida, características de absorción, análisis de azúcares, ácidos orgánicos y los valores Rf.

Los análisis realizados indican que los pigmentos incluyen:

Malvidina 3-monoglucósido acilado con ácido p-cumárico; Malvidina 3-monoarabinósido; peonidina 3-monoarabinósido; Malvidina 3,5-diarabinósido acilada con ácido p-cumárico; Peonidina 3-diarabinósido acilada con ácido p-cumárico; Malvidina 3-monoarabinósido acilada con ácido p-cumárico. Los otros pigmentos pueden considerarse como un 3-monoglicósido del tipo de la peonidina y un 3,5 diglicósido posiblemente del tipo de la peonidina.

SUMMARY

The anthocyanin pigments of Niabell grapes were isolated and purified by paper chromatography. The purified pigments were then subjected to acid hydrolysis. The identification of the individual pigments was made based on the data coming from the analysis of the acid hydrolysis, spectral characteristics, sugar moieties and acyl groups determinations and Rf. values. The same treatment was done to the crude extract containing all the anthocyanins.

The pigments turned out to be: malvidin 3-monoglucoside acylated with p-coumaric acid, malvidin 3-monoarabinoside, peonidin 3-monoarabinoside, malvidin 3,5 diarabinoside acylated with p-coumaric acid, peonidin 3-diarabinoside acylated with p-coumaric acid, malvidin 3-monoarabinoside acylated with p-coumaric acid. The other pigments may be regarded as a 3-monoglycoside of the peonidin type and 3,5-diglycoside possibly of the peonidin type.

RÉSUMÉ

Ils ont été isolés et purifiés les anthocyanines des raisins var. Niabell au moyen de la chromatographie en papier. L'identification des pigments purifiés a été faite au moyen des résultats obtenues de l'hydrolise acide, des caractéristiques d'absorption, de l'analyse des sucres, de les acides organiques et les valeurs de le Rf.

Les analyses réalisées indiquent que les pigments possèdent:

Malvidine 3-monoglucoside acylé avec l'acide p-coumarique; Malvidine 3-monoarabinoside, peonidin 3-monoarabinoside; Malvidine 3,5 diarabinoside acylé avec l'acide p-coumarique; Peonidine 3-diarabinoside acylé avec l'acide p-coumarique, malvidine 3-monoarabinoside acylé avec l'acide p-coumarique.

Les autres pigments peuvent être considérés comme un 3-monoglycoside du type de la peonidine et un 3,5 diglicoside posiblement du type de la peonidine.

BIBLIOGRAFIA

- ABE, Y. and HAYASHI, K. (1956). Further studies on paper chromatography of anthocyanins, involving an examination of glycoside types by partial hydrolysis. Studies on anthocyanins XXIX. Botan. Mag. (Tokyo), 69, 822, 577.
- AKIYOSHI, M., WEBB, A. D. and KEPNER, R. E. (1963). The major anthocyanin pigments of vitis vinifera varieties. Flame Tokay, Emperor and Red Malaga. Journal of Food Science., 28, 2, 177.
- ALBACH, R. F., KEPNER, R. E. and WEBB, A. D. (1963). Peonidin 3-monoglucoside in vinifera grapes. Journal of Food Science, 28, 1, 55.
- ALBACH, R. F., KEPNER, R. E. and WEBB, A. D. (1965). Structures of acylated anthocyan pigment in vitis vinifera variety Tinta Pinheira. Identification of anthocyanidin, sugar and acid moieties. Journal of Food Science, 30, 69.
- BATE-SMITH, E. C. (1948). Paper chromatography of antocyanins and related substances in petal extracts. Nature, 161, 835.
- BATE-SMITH, E. C. and WESTALL, R. G. (1950). Chromatography behavior and chemical structure. I. Some naturally occurring phenolic substances. Biochem. Biophys. Acta, 4, 427.

- BONNIE, H. S. and FRANCIS, F. J. (1967). Apple anthocyanins. Identification of cyanidin 7-arabinoside. *Journal of Food Science*, *32*, 647.
- CARREÑO and LUH. (1967). Anthocyanin Pigments in Trousseau Grapes. Tesis de la Universidad de California, Davis.
- CHEN, L. F., LUH, B. S. (1967). Identification of anthocyanins in Royalty Grapes. *Journal of Food Science*, *32*, 1, 66.
- CHEN, L. F. and LUH, B. S. (1965). Identification of anthocyanins in Royalty grapes. Tesis de la Universidad de California, Davis.
- CO, H. and MARKAKIS, P. (1968). Flavonoid compounds in the Strawberry fruits. *Journal of Food Science*, *33*, 3, 281.
- DARAVINGAS, G. and CAIN, R. F. (1965). Changes in the anthocyanin pigments of raspberries during processing and storage. *Journal of Food Science*, *30*, 400.
- ELBE, J. H. and SCHALLER, D. R. (1968). Hydrochloric acid in isolating anthocyanin pigments from Montmorency cherries. *Journal of Food Science*, *33*, 439.
- ELBE, J. H., BIXBY, D. G. and MOORE, J. D. (1969). Electrophoretic comparison of anthocyanin pigments in eight varieties of sour cherries. *Journal of Food Science*, *34*, 2, 103.
- EL KHIDIR, O. H. (1969). Anthocyanins in Red onions. M. S. Thesis. Dept. of Food Science & Techn. University of California, Davis.
- FULEKI, T. and FRANCIS, F. J. (1968). Quantitative method anthocyanins. Extraction and determination of total anthocyanin in Cranberries. *Journal of Food Science*, *33*, 72.
- HAMDY, M. K., PRATT, D. E., POWERS, J. J. and SOMAATMADJA, D. (1961). Disc sensitivity assay of inhibition of bacterial growth by pelargonidin 3-monoglucoside and its degradation products. *Journal of Food Science*, *26*, 457.
- HARBORNE, J. B. (1958a). The chromatographic identification of anthocyanin pigments. *J. Chromatography*, *1*, 473.
- HARBORNE, J. B. (1958b). Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem. J.* *70*, 1, 22.
- HAYASHI, K. (1962). The anthocyanins in "The Chemistry of flavonoid compounds". Ed. by Geissman. The Macmillan Company.
- HSIA, C. L., LUH, B. S. and CHICHESTER, C. O. (1965). Anthocyanin in freestone peaches. *Journal of Food Science*, *30*, 1, 5.
- JURD, L. (1962). Spectral properties of flavonoid compounds. In the chemistry of flavonoid compounds. (Geissman, T. A., ed.) 107, Macmillan Co., N. Y.
- LYNN, D. Y. C. and LUH, B. S. (1964). Anthocyanin pigments in Bing cherries. *Journal of Food Science*, *29*, 6, 735.
- OLMO, H. P. and Koyama, A. (1962). Bulletin 790 California Agricultural Experiment Station, Division of Agricultural Sciences, University of California, Davis.
- RANKINE, B. C., KEPNER, R. E. and WEBB, A. D. (1958). Comparison of anthocyanin pigments of vinifera grapes, *Am. J. Enol.*, *9*, 105.

- SCHALLER, D. R. and VON ELBE, J. H. (1968). The minor pigment component of Montmorency cherries. *Journal of Food Science*, *33*, 4, 442.
- SEIKEL, K. M. (1962). Chromatographic method of separation, isolation and identification of flavonoid compounds in "The chemistry of flavonoid compounds", ed. Geissman. Macmillan Co., N. Y., 34.
- SMITH and LUH. (1966). Anthocyanin Pigments in Rubired Grapes. Tesis de la Universidad de California, Davis.
- SOMAATMADJA, D. and POWER, J. J. (1963). Anthocyanin pigments of Cabernet Sauvignon grapes. *Journal of Food Science*, *28*, 6, 617.
- SWAIN, T. (1953). The identification of coumarins and related compounds by filter paper chromatography. *Biochem. J.* *53*, 200.
- VENTAKARAMAN, K. (1962). Methods for determining the structures of flavonoid compounds in "The chemistry of flavonoid compounds", ed. by Geissman. The Macmillan Co., N. Y., 70.
- WROLSTAD, R. E. and HEATHERBEL, D. A. (1968). Anthocyanin pigment of rhubarb Canada Red. *Journal of Food Science*, *33*, 592.
- WROLSTAD, R. E., PUTMAN, T. B. (1969). Isolation of Strawberry anthocyanin pigments by adsorption on insoluble polyvinyl-pyrrolidone. *Journal of Food Science*, *34*, 2, 154.