



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

**ITM**

**EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y ESTABILIDAD DE LAS  
ANTOCIANINAS DE CÁSCARA DE *Chrysophyllum cainito* L.,  
CULTIVADO EN YUCATÁN**

OPCIÓN  
**TESIS PROFESIONAL**

PARA OPTAR AL TÍTULO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y  
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:  
**IBQ. CINDIALY YULIET KU CANUL**

ASESOR:  
**DR. VÍCTOR MANUEL MOO HUCHÍN**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO  
2021





**DEPENDENCIA:** Div. de Est. de Posg. e Inv.  
**No. DE OFICIO:** X-193/21  
Mérida, Yucatán, 17/junio/2021

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

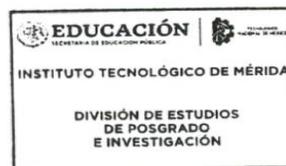
**C. CINDIALY YULIET KU CANUL**  
**PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIA**  
**DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**  
**PRESENTE.**

De acuerdo al fallo emitido por su director **Victor Manuel Moo Huchin**, y la comisión revisora integrada por su coasesor Raciél Javier Estrada León, Elizabeth de la Luz Ortiz Vázquez, y Enrique Sauri Duch, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

**“EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS DE CÁSCARA DE *Chrysophyllum cainito* L., CULTIVADO EN YUCATÁN.”**

**ATENTAMENTE**  
*Excelencia en Educación Tecnológica*  
*“In Hoc Signo Vinces”*

**M.C. Hermilia Andrea Sanbarri Benítez**  
**Jefa de la División de Estudios de**  
**Posgrado e Investigación**



ccp. Archivo  
HAÜB/EOV/zac



Km.5 Carretera Mérida-Progreso A.P 911 C.P 97118 Mérida Yucatán, México, Tels. 964-50-00, Ext. 10001, 10401 10601,10201  
email: contacto@merida.tecnm.mx  
web: itmerida.mx



## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, le doy gracias a Dios por permitir concluir este trabajo, por ser mi guía y mi fuerza.

A mi gran amor Daniel por toda su paciencia, motivación, apoyarme en todas las formas posibles y por ser mi acompañante en todo momento.

A mis padres por todo su amor, apoyo e impulsarme a seguir con mis metas. A mis hermanos Arely, Humberto y mis sobrinos Johan, Zoé y Adriel por creer en mí y ser mi motivo de superación.

Doy muchas gracias a mis amigos y compañeros Daniel, Ise, Angy y Lupita, por todo su apoyo y ayuda, por compartir sus conocimientos y por esa amistad que me han brindado.

A mis amigas Viki y Sarita por apoyarme y animarme en todo momento.

Al Dr. Victor Manuel asesor y director de este trabajo, por compartir sus conocimientos, brindarme las herramientas y orientarme para mejorar en este ámbito, por su paciencia y dedicación.

Al Dr. Sauri Duch, al Dr. Raciél por sus sugerencias y orientación en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Elizabeth Ortíz, por el apoyo y consideración en todo momento.

Al Instituto Tecnológico de Mérida y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por hacer posible la realización de este trabajo.

A la Dra. Sonia de Pascual-Teresa Fernández por el apoyo en la realización de análisis en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Madrid, España.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico a mi Dios, quien es mi guía, mi fortaleza, le doy gracias por todas las oportunidades que me ha brindado, por todo su amor y paciencia, por brindarme, sabiduría, calma y fe.

*Porque Dios da la sabiduría, de su boca viene el conocimiento y la inteligencia. (Proverbios 2:6)*

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	III
DEDICATORIA.....	IV
TABLA DE CONTENIDO.....	V
ÍNDICE DE TABLAS .....	VIII
ÍNDICE FIGURAS .....	IX
ÍNDICE DE ANEXOS.....	X
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT .....	XII
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Cáscara de Caimito ( <i>Chrysophyllum cainito</i> L.) como fuente de antocianinas.....	3
2.1.1. Descripción .....	3
2.1.2. Composición química .....	5
2.2. Antocianinas .....	8
2.2.1. Antocianinas como colorantes .....	8
2.2.2. Generalidades.....	9
2.2.3. Química de las antocianinas.....	9
2.3. Vegetales como fuente de antocianinas.....	12
2.4. Propiedades funcionales de las antocianinas .....	13
2.5 Estabilidad .....	15
2.5.1. Estructura química .....	15
2.5.2. Efecto del pH .....	16
2.5.3. Efecto de la temperatura .....	19
2.5.4 Efecto de la presencia de azúcares.....	19

2.5.5 Actividad de agua ( $a_w$ ) .....	19
2.5.6 Luz .....	20
2.5.7 Ácido ascórbico .....	20
2.5.8 Oxígeno.....	21
2.5.9 Otros factores .....	21
2.6 Extracción de antocianinas .....	21
2.7 Estudios de la extracción de antocianinas a partir de subproductos vegetales .....	23
2.8 Metodología de superficies de respuesta .....	25
2.8.1. Diseño con superficie de respuesta .....	25
2.8.2. El diseño central compuesto como herramienta en la optimización .....	25
2.8.3. Diseño de composición central con centro en las caras .....	25
3. OBJETIVOS .....	26
3.1. Objetivo general .....	26
3.2. Objetivos específicos .....	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
4.1 Estrategia general de trabajo.....	27
4.2. Materia prima .....	28
4.3. Evaluación de algunas características fisicoquímicas del fruto.....	29
4.3.1. Sólidos solubles totales (SST) y Acidez total titulable (ATT). .....	29
4.3.2 Determinación de color instrumental.....	29
4.4 Diseño experimental y análisis estadístico. Extracción de antocianinas .....	30
4.5 Obtención de extracto de antocianinas (EAO) mediante el proceso de extracción optimizado .....	33
4.6. Caracterización del extracto de antocianinas (EAO).....	33
4.6.1. Determinación de antocianinas totales.....	33

4.6.2. Compuestos fenólicos solubles totales.....	34
4.6.3 Determinación de la densidad del color y el color polimérico del extracto EAO .....	34
4.6.4 Actividad antioxidante.....	35
4.6.4.1 Método ABTS .....	35
4.6.4.2. Poder Reductor.....	36
4.6.5 Identificación y cuantificación de antocianinas individuales por HPLC .....	36
4.6.6 Identificación de antocianinas y compuestos fenólico por HPLC-MS-QTOF .....	37
4.7 Estabilidad del extracto EAO .....	37
4.7.1 Estabilidad del extracto EAO expuesto diferentes pH's y al almacenado a 4°C y 25 °C	37
4.7.2 Estudio de estabilidad de antocianinas ante la luz .....	38
4.8. Cinética química .....	38
4.8. 1. Cinética química en la degradación de antocianinas .....	38
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	39
5.1 Características fisicoquímicas del fruto.....	39
5.2 Obtención de parámetros para la optimización .....	41
5.3. Efecto de las variables de proceso sobre el contenido de antocianinas totales .....	45
5.4 Optimización y predicción.....	47
5.5 Cuantificación de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante en EAO .....	49
5.7 Estudio de estabilidad de extracto de antocianinas de la cáscara <i>Chrysophyllum cainito</i> L. a diferentes pH almacenados a 4 °C y 25°C.....	56
5.8 Estudio de estabilidad de extracto de antocianinas de la cáscara <i>Chrysophyllum cainito</i> L. ante luz.....	59
6. CONCLUSIONES .....	61
7. REFERENCIAS.....	62
ANEXOS.....	76

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición nutrimental por 100g de <i>Chrysophyllum Cainito</i> L.....	6
<b>Tabla 2</b> Algunas características fisicoquímicas de la pulpa de caimito morado ( <i>Chrysophyllum cainito</i> L.) cultivado en Yucatán .....	6
<b>Tabla 3</b> Contenido de compuestos bioactivos presentes en la pulpa de Caimito morado ( <i>Chrysophyllum cainito</i> L.) .....	7
<b>Tabla 4</b> Contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales en la cáscara de <i>Chrysophyllum cainito</i> L.....	7
<b>Tabla 5</b> Vegetales como fuente de antocianinas .....	12
<b>Tabla 6</b> Estudio de extracción de antocianinas en diversas matrices vegetales .....	23
<b>Tabla 7</b> Diseño experimental para el proceso de extracción de antocianinas a partir de cáscara de la fruta <i>C. cainito</i> . .....	31
<b>Tabla 8</b> Factores y los niveles analizados en el diseño DCC.....	32
<b>Tabla 9</b> Características físicoquímicas del <i>Chrysophyllum cainito</i> L.....	41
<b>Tabla 10</b> Contenido de antocianinas totales del extracto de la cáscara.....	43
<b>Tabla 11</b> Coeficientes de regresión estimados del polinomio de segundo orden ajustado para antocianinas totales .....	44
<b>Tabla 12</b> Valores de optimización de los factores para la recuperación máxima de antocianinas.....	47
<b>Tabla 13</b> Comparación del extracto de antocianinas entre <i>C. cainito</i> y Zarzamora mediante su contenido fenólico, actividad antioxidante y propiedades del color .....	50
<b>Tabla 14</b> Antocianinas identificadas en la cáscara de <i>C. cainito</i> por HPLC-MS-QTOF .....	52
<b>Tabla 15</b> Compuestos fenólicos identificados en la cáscara de <i>C. cainito</i> por HPLC-MS-QTOF.....	53
<b>Tabla 16</b> Constante de velocidad de degradación, tiempo de vida media de antocianinas de <i>Chrysophyllum cainito</i> L. a diferentes pHs después de su almacenamiento a 4 y 25 °C .....	58
<b>Tabla 17</b> Constante de degradación, vida media de antocianinas de <i>Chrysophyllum cainito</i> L. ajustado a pH de 4.3, almacenamiento en presencia y ausencia de luz almacenados a 30°C.....	59

## ÍNDICE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución de la fruta caimito ( <i>Chrysophyllum cainito</i> L). .....	3
<b>Figura 2.</b> Árbol de <i>Chrysophyllum cainito</i> L. ....	4
<b>Figura 3.</b> Caimito morado ( <i>Chrysophyllum cainito</i> L.). ....	5
<b>Figura 4.</b> Estructura y coloraciones que imparten las antocianinas. ....	8
<b>Figura 5.</b> Estructura fundamental del catión flavilio de las antocianinas .....	9
<b>Figura 6.</b> Estructura y sustituyente de las antocianinas.....	10
<b>Figura 7.</b> Agliconas de antocianinas más comunes en frutas y vegetales. ....	11
<b>Figura 8.</b> Efecto del pH en la estructura y la estabilidad de las antocianinas. ....	17
<b>Figura 9.</b> Transformaciones estructurales de antocianinas en solución acuosa a pH variable.....	18
<b>Figura 10.</b> Efecto de la variable de extracción sobre el contenido de antocianinas totales (mg/g cáscara liofilizada).....	46
<b>Figura 11.</b> Perfil de antocianinas de extracto de <i>Chrysophyllum cainito</i> L.por HPLC (A) , ampliación del espectro (B).....	48
<b>Figura 12.</b> Extracto de antocianinas del polvo de cáscara de caimito morado ( <i>Chrysophyllum cainito</i> L.) .....	49
<b>Figura 13.</b> Perfil cromatográfico de antocianinas del extracto de <i>C. cainito</i> ajustado a pH 4.3 y almacenado en presencia o ausencia de luz a 30°C. ....	60

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo A.</b> Rendimiento y pureza del extracto obtenido bajo condiciones óptimas .....	76
<b>Anexo B.</b> Cambio de color CIE del extracto de antocianinas de <i>Chrysophyllum cainito</i> L ajustado a distintos valores de pH y almacenamiento a 4 y 25 °C.....	76
<b>Anexo C.</b> Contenido de antocianinas de <i>C. cainito</i> durante cinco semanas de almacenamiento en refrigeración y temperatura a 25°C .....	78
<b>Anexo D.</b> Cambio de color CIE del extracto de <i>Chrysophyllum cainito</i> L. ajustado a diferentes valores de pH y almacenados a 4°C .....	79
<b>Anexo E.</b> Cambio de color CIE de extracto de <i>Chrysophyllum cainito</i> L. ajustado a diferentes valores de pH y almacenados a 25°C .....	80
<b>Anexo F.</b> Espectro de absorción de antocianinas del extracto <i>C. cainito</i> ajustado a pH 2.5, almacenado a 4 °C y 25°C. ....	81
<b>Anexo G .</b> Espectro de absorción de antocianinas del extracto de <i>C. cainito</i> ajustado a pH 3, almacenado a 4 °C y 25°C.. ....	82
<b>Anexo H .</b> Espectro de absorción de antocianinas del extracto <i>C. cainito</i> ajustado a pH 4.3, almacenado a 4 °C y 25°C. ....	83
<b>Anexo I .</b> Cambio de color del extracto de antocianinas de <i>Chrysophyllum cainito</i> L. ajustado a pH de 4.3, almacenado a 30°C en presencia y ausencia de luz.....	84
<b>Anexo J.</b> Cambio de color del extracto de antocianinas de <i>Chrysophyllum cainito</i> L. ajustado a pH de 4.3 almacenado a 30°C en presencia y ausencia de luz.....	85
<b>Anexo K.</b> Espectro de absorción de antocianinas del extracto <i>C. cainito</i> ajustado a pH 4.3, almacenado en presencia o ausencia de luz a 30°C. ....	86

## RESUMEN

Existe un interés científico en mejorar los procesos de extracción de antocianinas a partir de desperdicios de las frutas tales como la cáscara de *C. cainito*; además es importante investigar la estabilidad de estos pigmentos para su posible incorporación en productos alimenticios como colorantes o bioactivos. El objetivo de este trabajo fue extraer y caracterizar un extracto rico en antocianinas de cáscara liofilizada de *C. cainito*, y evaluar la estabilidad de estos pigmentos a diferentes condiciones de pH, temperatura y luz. Los experimentos de extracción se realizaron de acuerdo al diseño central compuesto, mientras que la aplicación de la metodología de superficie de respuesta (MSR) fue para ajustar un modelo a los datos del contenido de antocianinas totales, logrando determinar las condiciones óptimas de extracción de antocianinas que fueron: tiempo de extracción de 93.58 min, relación de disolvente a polvo de cáscara de 64.61 mL/g y una temperatura de 44.7 °C; obteniendo un extracto de antocianinas óptimo (EAO) con un contenido de antocianinas totales de 3.1 mg cianidina-3-glucósido/g cáscara liofilizado. Se encontró que EAO es más estable a un pH de 4.3, almacenado a bajas temperaturas y protegido de la luz, debido que ante este último factor se observó poca estabilidad.

Por medio de HPLC-MS-QTOF se logró identificar la presencia de siete antocianinas en EAO (Delfinidina -3-glucósido, Cianidina-3-galactósido, Cianidina-3-glucósido, Pelargonidina-3-galactósido, Pelargonidina -3- glucósido, Cianidina- 3 –malonil glucósido), seis flavanoles, doce flavonoles y tres ácidos fenólicos, cuya presencia de estos compuestos en el extracto está relacionado con una alta actividad antioxidante, potenciando a la cáscara de *Chrysophyllum cainito* L. como buena fuente de antocianinas y otros compuestos fenólicos.

**Palabras clave:** *Chrysophyllum cainito* L, antocianinas, optimización, extracción.

## ABSTRACT

Nowadays, a significant interest regarding the improvement for anthocyanin extraction processes from fruit waste such as *C. cainito* peel has arisen among scientific community; Furthermore, it is important to investigate the stability of such pigments in order to evaluate the viability to be incorporated into food products as colorants or bioactives. Aim of this work was to isolate and to characterize an extract rich in anthocyanins obtained from the lyophilized peel of *C. cainito* and to evaluate the stability of these pigments at different pH, temperature and light conditions. The extraction experiments were carried out according to the central composite design. On the other hand, the application of the response surface methodology (RSM) was used to fit a model to the data of the total anthocyanin content, By these means, the optimal anthocyanin extraction conditions were determined: extraction time of 93.58 min, solvent to peel powder ratio of 64.61 mL/g and a temperature of 44.7 °C. An optimal anthocyanin extract (EAO) with a total anthocyanin content of 3.1 mg cyanidin-3-glucoside/g lyophilized peel was obtained. EAO was found to be more stable at a pH of 4.3 stored at low temperatures and protected from light, due to the fact that a low stability was observed against this last factor. Through HPLC-MS-QTOF it was possible to identify the presence of seven anthocyanins in EAO (Delphinidin -3-glucoside, Cyanidin-3-galactoside, Cyanidin-3-glucoside, Pelargonidin-3-galactoside, Pelargonidin -3-glucoside, Cyanidin - 3 -malonyl glucoside), six flavanols, twelve flavonols and three phenolic acids, whose presence in the extract is related to a high antioxidant activity, maximizing the *Chrysophyllum cainito* L. peel as a potential source of anthocyanins and other phenolics compounds.

**Keywords:** *Chrysophyllum cainito* L, anthocyanins, process optimization, chemical extraction.

## 1. INTRODUCCIÓN

El Sureste de México (Península de Yucatán) es una región privilegiada con un reservorio importante de frutas tropicales con colores, sabores y aromas agradables; resaltando particularmente su alto contenido de compuestos bioactivos. Las fracciones comestibles y no comestibles de las frutas tropicales pueden ser utilizadas como nutraceuticos o como ingredientes de alimentos funcionales con el propósito de favorecer determinados efectos saludables. Existe un interés en la obtención de extractos de compuestos bioactivos con propiedades benéficas a la salud para diversas aplicaciones en la industria alimentaria, tales como, enriquecimiento de alimentos, fortificantes, potenciadores de sabor, conservadores de alimentos, colorantes, antioxidantes naturales, etc (Lourenço, Moldão-Martins y Alves, 2019; Kumoro et al., 2020; Gómez-García et al., 2020). Los compuestos bioactivos como los flavonoides y polifenoles presentes en muchas frutas y vegetales contribuyen en sus propiedades antioxidantes, antibacterianas, antihiperlipidémicas, anticancerígenas, cardioprotectoras, neuroprotectoras y antidiabéticas (Zeb, 2020).

El caimito (*Chrysophyllum cainito* L.) es una de las frutas de la familia Sapotaceae más populares en la Península de Yucatán, México, y es originario de América Central, aunque otros autores consideran que es nativo de las Indias Occidentales. La pulpa de *C. cainito* es suave, de sabor dulce y con un aroma agradable, y tradicionalmente, se consume fresca y también en conservas y bebidas. Acorde a Moo-Huchin et al. (2014), el rendimiento de la pulpa de *C. cainito* cultivado en Yucatán, México es de 47.3% y la otra fracción corresponde a la cáscara y semillas. Los mismos autores reportaron que la pulpa de esta fruta es rica en fibra soluble e insoluble, antocianinas, flavonoides y con alta actividad antioxidante. La cáscara de *C. cainito* es de color púrpura con un contenido importante de polifenoles tales como el ácido gálico, ácido clorogénico, catequina, ácido elágico, ácido cafeico, ácido ferúlico, miricetina y quercetina (Can-Cauich et al., 2017). Acorde a Doan y Le (2020), los extractos de las hojas, corteza del tallo, los frutos, la cáscara, la pulpa o la semilla de *C. cainito* son candidatos prometedores en la medicina tradicional. En un estudio realizado por Chel-Guerrero et al. (2018), demostraron que la cáscara de *C. cainito* tiene alta actividad antiviral. Asimismo, se ha reportado un efecto gastroprotector y antiulceroso de la cáscara, semillas y pulpa de *C. cainito* utilizando modelos experimentales de úlceras (da Rosa et al., 2019). Sin embargo, los estudios sobre la extracción y estabilidad de antocianinas a partir de la cáscara de *C. cainito* son escasos. Las antocianinas de las frutas son pigmentos solubles en agua con estructura de catión

flavilio ( $AH^+$ ) que actúan como ácidos y son responsables de las coloraciones roja, rosa, violeta y azul de cerezas, fresas, berries, ciruelas entre otros (Castañeda-Ovando et al., 2009). Estos pigmentos son potentes nutraceuticos cuyo consumo se ha relacionado con diversos beneficios a la salud (antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenas, obesidad, diabetes, etc.) (Dini, Zaro y Viña, 2019). El uso potencial de las antocianinas como colorante y su estabilidad están influenciados por el pH, la luz, la temperatura y la estructura (Khoo et al., 2017).

Debido al interés de obtener un alto rendimiento de extracción de las antocianinas e investigar la estabilidad de estos pigmentos para su posible incorporación en productos alimenticios, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la recuperación de las antocianinas de la cáscara de *C. cainito*, mediante extracción sólido-líquido, aplicando la metodología de superficie de respuesta para determinar las condiciones (temperatura, relación disolvente-sólido y tiempo) en las que se tiene mayor extracción de pigmentos. Además de caracterizar el extracto de antocianinas obtenido mediante las condiciones previas, se investigó la estabilidad del extracto al pH, luz y temperatura.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Cáscara de Caimito (*Chrysophyllum cainito* L.) como fuente de antocianinas

#### 2.1.1. Descripción

El caimito (*Chrysophyllum cainito* L.) es una planta herbácea de la familia de la *Sapotaceae* donde se incluye cerca de 800 especies (Rojas y Torres, 2012; Sánchez et al., 2009).

El árbol de *Chrysophyllum cainito* L. se considera originario de las Antillas y con la llegada de los europeos su cultivo se extendió al resto del continente, de manera que en la actualidad se encuentra naturalizado del suroeste de México hasta Panamá, representado en la Figura 1 (Morton, 1987).



**Figura 1.** Distribución de la fruta caimito (*Chrysophyllum cainito* L.).

El árbol del caimito mide entre 10 a 25 m de altura y de 20 a 50 cm de diámetro. Copa umbelada y con follaje lustroso (Figura 2). El desprendimiento de cualquier parte de la planta produce el flujo exudado lechoso (Sánchez et al., 2009). Las hojas son astringentes, simples y alternas, con el haz verde oscuro y en el envés marrón castaño y brillante por lo cual igual es conocido como árbol de hojas doradas, de 6 a 14 cm de largo y de 3 a 5 cm de ancho, elípticas, con ápice acuminado, bordes enteros y base obtusa. Pecíolos de 0.8 a 2 cm de largo y acanalados en la parte superior (OFICATIE, 2010; Sánchez et al., 2009).



**Figura 2.** Árbol de *Chrysophyllum cainito* L.

Fuente: <http://www.plantant.com>

Por el color de su cáscara, el fruto de *Chrysophyllum cainito* L., puede ser morado o verde (Popenoe, 1953), donde el cainito con cáscara color morado o púrpura tiene más sabor y es más rico en azúcar; es un fruto no climatérico y la parte comestible la constituye una pulpa blanca, dulce, jugosa y algo astringente (Calabria, 1968). Este fruto puede tener hasta 10 semillas marrón oscuro (Delascio, 1985; Morton, 1987); sin embargo, de acuerdo con Álvarez-Vargas et al. (2006) se ha encontrado frutos con un máximo de 8 semillas, así como frutos sin semilla. Los frutos (Figura 3) no caen de la planta cuando alcanzan la madurez fisiológica, por lo tanto, estos deben ser cosechados a mano. Para alcanzar una maduración adecuada los frutos deben ser cosechados en el estado apropiado, el cual se puede precisar cuando el color del fruto cambia a púrpura o verde opaco y es suave al tacto (Zambrano et al., 2013). La planta en condiciones favorables puede llegar a producir entre 90 y 113 kg o más frutos por año (Campbell, 1974).



**Figura 3.** Caimito morado (*Chrysophyllum cainito* L.).

Algunas propiedades se le han atribuido al árbol de *Chrysophyllum cainito* L., por ejemplo, las semillas son diuréticas, por su parte, las hojas han sido empleadas de manera tradicional como remedio para heridas cutáneas, sin embargo, en el estudio de Shailajan y Gurjar (2016), se ha evaluado su potencial en la cicatrización mediante el empleo de un extracto etanólico de las hojas en conejos, donde fue observado un cierre completo de heridas a los 12 días del tratamiento, donde no hubo evidencia de toxicidad o mortalidad en el modelo empleado, demostrando ser una fuente segura para su uso tópico.

La pulpa y la semilla han demostrado propiedades antimicrobianas contra *Escherichia coli* y especies de *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Candida* y *Penicillium* (Oranusi, Braide y Umeze, 2015). Por su parte, Chel-Guerrero et al. (2018) reporta que los extractos de cáscara de *Chrysophyllum cainito* L. poseen actividad antiviral contra la transcriptasa inversa de VIH-1, con valores de inhibición de 75 %.

### **2.1.2. Composición química**

En base con los datos reportados por la Base de Datos Internacional de Composición de Alimentos en plataforma de FUNIBER la composición reportada de fruto de caimito es la que se indica en la Tabla 1.

**Tabla 1.***Composición nutrimental por 100g de Chrysophyllum Cainito L*

Nutrientes	Cantidad	Nutrientes	Cantidad	Nutrientes	Cantidad
Energía	61	Fibra (g)	1.10	Vitamina C (mg)	10
Proteínas	0.90	Calcio (mg)	20	Vitamina D (µm)	--
Grasa total (g)	1.30	Hierro (mg)	0.50	Vitamina E (mg)	0
Colesterol (mg)	-----	Yodo (µm)	-----	Vitamina B12 (µm)	---
Glúcidos	13.10	Vitamina A (mg)	1.67	Folato (µm)	0

En la Tabla 2, de acuerdo con el estudio realizado por Moo-Huchín et al. (2014), reportaron los valores de algunas características fisicoquímicas de la pulpa del caimito morado (*Chrysophyllum cainito* L.) proveniente del estado de Yucatán.

**Tabla 2**

*Algunas características fisicoquímicas de la pulpa de caimito morado (Chrysophyllum cainito L.) cultivado en Yucatán*

Humedad (g/100 g)	Sólidos solubles totales (° Brix)	L°	Tono (°hue)	Acidez titulable (g de ácido cítrico /100 g pulpa)
84.67 ± 0.06	11.80 ± 0.06	54.77 ± 0.55	348.42 ± 0.84	0.26 ± 0.0004

Los valores se expresan como promedio ± estándar (n = 6)

Respecto al contenido de fibra en la pulpa del caimito morado (*C. cainito*), Moo-Huchin et al. (2014) reportan los valores de fibra total, fibra soluble y fibra insoluble, los valores fueron de 35.68, 2.72 y 32.96 g/100 gramos de peso seco, respectivamente. De igual manera, cuantificaron el contenido de compuestos bioactivos (Tabla 4).

**Tabla 3**

*Contenido de compuestos bioactivos presentes en la pulpa de Caimito morado (Chrysophyllum cainito L.)*

mg de vitamina C/100 g PH	Antocianinas totales (mg TA/100g PH)	Compuestos fenólicos totales (mg de EAG / 100g PH)	Flavonoides totales mg de quercetina /100 PS)	Carotenoides totales ( mg de β- caroteno /100 g PS)
21.43 ± 4.99	3.24± 0.02	14.91 ± 0.19	35.76 ± 1.46	2.97 ± 0.64

Nota: Los valores se expresan como promedio ± estándar (n = 6), PS= peso seco, PH= peso húmedo.

En el estudio realizado por Can-Cauich et al. (2017) se evaluaron los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante de polvos de cáscara de diversas frutas cultivadas en el sureste de México, entre ellas la cáscara de *Chrysophyllum cainito* L., donde se reporta valores de fenoles totales y flavonoides (Tabla 4).

**Tabla 4**

*Contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales en la cáscara de Chrysophyllum cainito L.*

Fenoles totales (g GAE/100 g PS)	Flavonoides totales (g QE/100 g PS)
1.84 ±0.07	2.34 ± 0.28

Nota: Los valores se expresan como promedio ± estándar (n = 6), PS= peso seco.

Fuente: Can-Cauich et al. (2017)

## 2.2. Antocianinas

### 2.2.1. Antocianinas como colorantes

Las antocianinas son los componentes responsables de los pigmentos de tonos amarillos, naranja, rojo, magenta, violeta y azul en las plantas (Tanaka y Ohmiya, 2008) (Figura 4). Estos compuestos son considerados como colorantes naturales seguros, poseen efectos benéficos comprobados y se encuentran entre los colorantes vegetales más utilizados en la industria alimentaria, principalmente en las bebidas alimenticias (Castañeda-Ovando et al., 2009; Pazmiño-Durán et al., 2001).

Las antocianinas se han estudiado en relación a cambios y estabilidad de los colores que imparten, durante el procesamiento y almacenamiento en diversas matrices de alimentos, como en el trabajo de Martínez et al. (2011), quienes estudiaron la estabilidad de las antocianinas en un jugo concentrado de Agraz (*Vaccinium meridionale Sw.*) almacenado a tres temperaturas de 4, 17 y 37 °C; en ese trabajo, se concluyó que a mayor temperatura de almacenamiento se produce un aumento en la degradación de las antocianinas. Sin embargo, por sus efectos positivos en la salud y su potencial aplicación en la industria, actualmente se prefiere el empleo de pigmentos naturales como las antocianinas como una alternativa para el reemplazo de los colorantes sintéticos (Koyama et al., 2016; Riha et al., 2015; Mena et al., 2014).



**Figura 4.** Estructura y coloraciones que imparten las antocianinas.

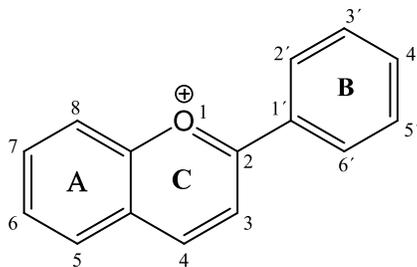
Fuente: Andy Brunnig/ Compound Interest, (2017)

### 2.2.2. Generalidades

La palabra antocianina deriva del griego *anthos* cuyo significado es flor y *kianos* es azul, son compuestos fenólicos hidrosolubles pertenecientes a la familia de los flavonoides, se sintetizan por medio de la ruta fenilpropanoide, la cual es regulada a nivel génico y altamente influenciada por factores ambientales. Estos compuestos son pigmentos responsables de los tonos amarillos, naranja, rojo, magenta, violeta y azul en las flores, frutos y tejidos vegetales (Tanaka y Ohmiya, 2008). Se han descrito más de 9,000 estructuras de flavonoides con información biológica; éstos incluyen más de 600 antocianinas diferentes que se distribuyen ampliamente entre al menos 27 familias, 73 géneros e innumerables especies.

### 2.2.3. Química de las antocianinas

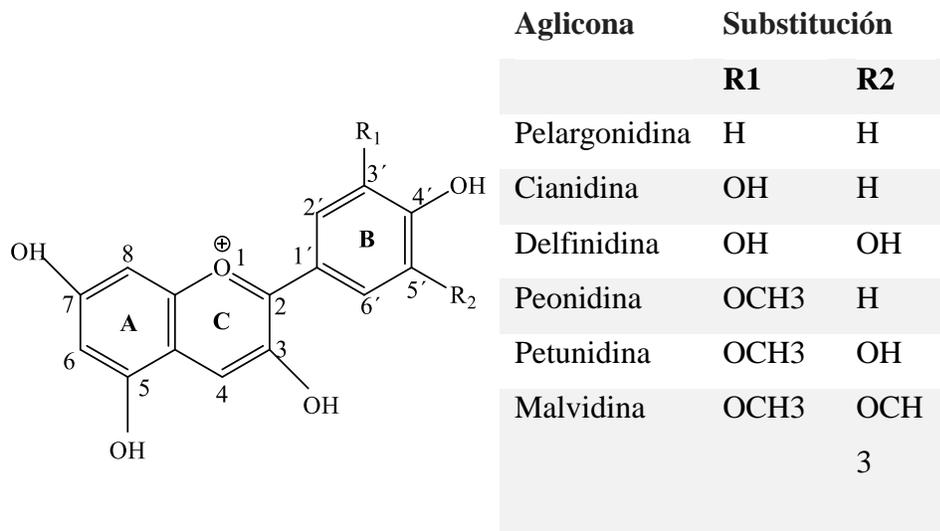
Las antocianinas son glucósidos hidrosolubles, constituidos por una antocianidina (aglicona) unida con una molécula de azúcar por medio de un enlace O-glucosídico. La estructura base de las antocianidinas es el ión flavilio o catión 2- fenilbenzopirilio (Figura 5), que consta de dos grupos aromáticos: un sistema heteroanular fusionado tipo benzopirilio formados por los anillos A y C y un anillo B de naturaleza fenólica. Por el carácter trivalente del oxígeno, el flavilo normalmente se comporta como un catión (Konczak y Zhang, 2004; Ocampo et al., 2008).



**Figura 5.** Estructura fundamental del catión flavilio de las antocianinas

Sin embargo, en la naturaleza normalmente la aglicona se encuentra unido a hidratos de carbono o azúcares, comúnmente de glucosa y ramnosa, seguidos por la galactosa, la xilosa, la arabinosa y, ocasionalmente la gentiobiosa, la rafinosa y la soforosa, unidos a la antocianidina principalmente por medio del hidróxilo en el carbono de la posición 3, y en segundo término el hidróxilo del carbono de la posición 5 o 7. Cuando en una misma molécula se encuentran dos azúcares, éstos se

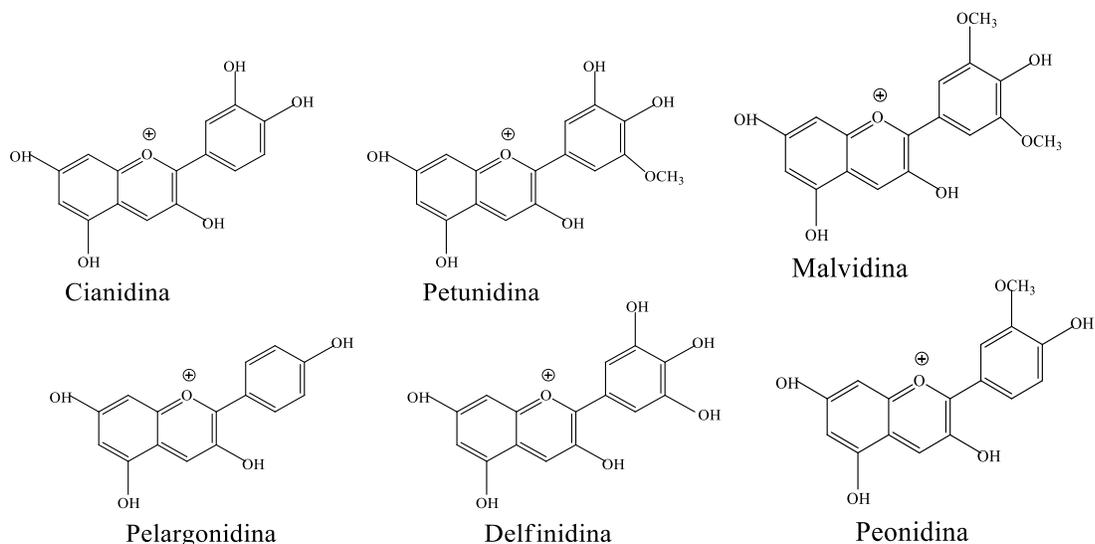
localizan en los hidroxilos 3 y 5, produciendo una estructura que generalmente es más estable que cuando tiene un solo monosacárido (Ocampo et al., 2008).



**Figura 6.** Estructura y sustituyente de las antocianinas

Fuente: Durst y Wrolstad (2001).

En la Figura 6 se muestra las variaciones estructurales del anillo fenólico (B) dando lugar a seis antocianidinas más comunes en vegetales, representado en la Figura 7 (Zapata, 2014). Con una distribución en frutas y vegetales de cianidina 50%, delfinida 12%, pelargonidina 12%, peonidina 12%, petunidina 7% y malvidina en menor proporción (Jiménez, 2017; Kong et al., 2003).



**Figura 7.** Agliconas de antocianinas más comunes en frutas y vegetales.

Aparte de glucosiladas se ha encontrado antocianinas acetiladas, con ácidos hidroxicinámicos como: el ácido p-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico y 3,5-dihidroxicinámicos, ácidos hidroxibenzoico como el ácido gálico y ácido alifáticos entre los cuales están malónico, málico, acético, oxálico, succínico y el tartárico.

Las antocianinas acetiladas se pueden encontrar en distintos vegetales como las zanahorias, rábanos rojos, papas rojas y col, en diversos estudios han demostrado tener mayor estabilidad ante factores como la luz, el calor y pH de la solución en contraste de pigmentos de antocianinas no aciladas como en la uva roja. Existe evidencia que el manonilo unido a la glucosa en el C3, ayuda a conservar el color aumentando la acidez media en la vacuola celular, por su parte, investigaciones más profundas han demostrado que las antocianinas que contienen derivados cinamoílo son capaces de isomerizar en forma cis y trans, donde el proceso de isomerización permite intensificación del color y la resistencia a la hidratación del anillo pirilo (Figueiredo et al., 1999, George et al., 2001; Yoshida et al., 1990, 2000, 2002, 2003). Por otro lado, estudios han demostrado que la estabilidad de las antocianinas aciladas a un pH superior a 5,0 como es el caso de antocianinas aciladas provenientes de la col roja que demostraron mayor estabilidad que las antocianinas no aciladas obtenidas del rojo uva, grosella negra y saúco. Por su parte, en un estudio donde se detectó la presencia de antocianinas acetiladas provenientes de col lombarda durante un calentamiento a 80 ° C demostró la influencia de las antocianinas acetiladas en la estabilidad térmica (Idaka, 1991; Fossen et al., 1998; Dyrby et al., 2001).

### 2.3. Vegetales como fuente de antocianinas

La obtención de pigmentos antociánicos ha sido objeto de estudio en los últimos años, debido principalmente a su potencial como colorante, sus propiedades benéficas para la salud, principalmente el poder antioxidante. En la Tabla 5 se presentan algunos trabajos de investigación realizados para la obtención e identificación de antocianinas en diversas fuentes vegetales especialmente de fracciones no comestibles, como es el caso del maíz morado donde fueron identificadas las antocianinas mayoritarias: la Cianidina-3-malonilglucósido y Cianidina-3-dimalonil-glucósido. Por su parte, en la cáscara de Capulí se identificaron como pigmentos mayoritarios la Cianidina-3-O-(6''-O- $\alpha$ -ramnopiranosil)- $\beta$ -glucopiranosido y la Cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranosido (Salina et al., 2013; Hurtado y Pérez, 2014).

**Tabla 5**

*Vegetales como fuente de antocianinas*

Fuente	Hallazgos	Referencia
 Maíz morado ( <i>Zea Mays L.</i> )	Uso de maíces de grano azul/morado para la elaboración de productos alimenticios con elevado contenido de antioxidantes, donde el peso y color del grano se correlacionaron con el contenido de antocianinas totales.	Salinas et al. (2013).
 Cáscara de Jaboticaba ( <i>Myrciaria spp.</i> )	Las cáscaras de jaboticaba con alto contenido de pigmentos antociánicos se consideran como alternativa viable para la elaboración de colorantes naturales.	Silva et al. (2010).



Cáscara del fruto de Capulí  
(*Prunus serotina spp capuli*  
(Cav) Mc. Vaug Cav)

La capacidad antioxidante del extracto de antocianinas de la cáscara de Capulí como una fuente potencial de compuestos antioxidantes para su uso en la industria de alimentos, farmacéutica o cosmética.

Hurtado y Pérez  
(2014).



Cáscara Higos azul-morado  
(*Ficus carica L.*)

La cáscara de higo, puede ser recomendada como fuente de colorante no sintético para alimentos de acidez intermedia.

Aguilera-Ortíz et  
al. (2012).



*Syzygium cumini*  
*L. Skeels*

Obtención de altos rendimientos de antocianina de los extractos de cáscara de frutos de *S. cumini*. Se considera como una alternativa para su uso como colorante de alimentos.

Chaudhary y  
Mukhopadhyay  
(2013).

---

Fuente: Elaboración propia.

#### 2.4. Propiedades funcionales de las antocianinas

El interés por los pigmentos antociánicos ha aumentado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas (Garzón, 2008). A continuación, se describen algunas de estas propiedades.

Las antocianinas se caracterizan por tener una deficiencia de electrones, esta carencia las hace muy reactivas frente a los radicales libres presentes en el cuerpo, por ende, pueden ser potentes antioxidantes naturales (Bridgers et al., 2010). La **actividad antioxidante** de las antocianinas depende principalmente de su estructura química, es decir del número y posición de sus grupos hidroxilos; de los dobles enlaces conjugados, así como de la presencia de donantes de electrones

en el anillo estructural, ante todo lo anterior las antocianinas son capaces de prevenir eficazmente la peroxidación aportando átomos de hidrógeno que neutralizan los radicales libres y, consecuentemente, interrumpen la reacción en cadena de oxidación (Ge y Ma, 2013; Sari et al., 2012).

**Reducción de la hiperglicemia**, la hiperglicemia ocurre debido a la hidrólisis del almidón por  $\alpha$ -amilasa de la saliva humana y por la liberación de glucosa en el intestino delgado por la acción de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, al inhibir éstas enzimas ocurre una reducción de hiperglicemia, lo cual es una alternativa para el control de la diabetes, ante la problemática que enfrentan los inhibidores terapéuticos de  $\alpha$ -glucosidasa como por ejemplo la acarbosa, en donde su uso conlleva a desórdenes digestivos como la diarrea y flatulencias, ante esto se ha optado por el uso de los inhibidores naturales como las antocianinas que pueden inhibir la enzima  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa, igual se encuentran relacionadas con protección de células beta, mejorando la resistencia a la insulina, una opción para el tratamiento de la diabetes (Bischoff, 1994; López-Martínez et al., 2014).

Las antocianinas, son agentes **antiangiogénicos** potenciales, una propiedad importante en la prevención del cáncer, ya que la antiangiogénesis es el proceso que impide la formación de nuevos vasos sanguíneos que suministran oxígeno al tumor, evitando el paso en la transición de tumores benignos a malignos (Khoo et al., 2017).

Las antocianinas son importantes nutraceuticos en el mantenimiento de la salud visual, esto se puede evidenciar en un estudio realizado a 132 pacientes con tensión normal, el glaucoma se trató con dos cápsulas de antocianinas de arándano (60.0 mg de antocianina en cada cápsula) y se demostró una mejoría en la función visual (Shim et al., 2012).

El consumo de antocianinas ayuda a **reducir el peso** corporal disminuyendo el tejido adiposo blanco y marrón, de igual manera con la supresión de los niveles de ARNm de las enzimas de síntesis de grasa, triacilglicerol y esterol bajo tal como fue reportado para una dieta a base de maíz morado (Tsuda et al., 2013).

Los compuestos fenólicos entre los cuales se encuentran las antocianinas poseen actividad **antimicrobiana** especialmente ante patógenos relacionados con los alimentos como lo son *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* al inhibir su crecimiento, la acción antimicrobiana de las antocianinas se refleja en el daño sobre la morfología bacteriana como pérdida de la integridad de la pared celular, membrana y matriz celular, así como inhibición de enzimas microbianas extracelulares y la privación de sustratos necesarios para el crecimiento microbiano, se ha

observado una mayor acción sobre las bacterias gram positivo que sobre las gran negativas debido a su estructura más compleja (Cisowska et al., 2011).

Las antocianinas también han demostrado efectos **antitrombóticos**, según lo reportando en un estudio *in vitro*, en donde las ratas fueron alimentadas con semillas de maíz que contenían antocianinas, las cuales fueron menos susceptibles a lesiones isquemia-reperfusión y reducción del tamaño del infarto (Toufektsian et al., 2008).

## **2.5 Estabilidad**

Las antocianinas pueden degradarse por medio de varios procesos que ocurren durante su extracción, procesamiento y almacenamiento, debido que son moléculas altamente reactivas y algunos factores como el oxígeno, la temperatura, la luz, las enzimas, el pH, la estructura química, la concentración, la luz, disolventes, proteínas, otros flavonoides e iones metálicos pueden afectar la química de las antocianinas y, en consecuencia, su estabilidad y color, sin embargo, las antocianinas poseen propiedades fisicoquímicas que les confieren estabilidad bajo distintas condiciones de almacenamiento (Rein, 2005).

La copigmentación intermolecular es una de las técnicas de estabilización más eficaces, donde se emplean interacciones hidrofóbicas entre las antocianinas y de los complejos ácido fenólicos para formar complejos estables, esto es sucede debido a que tanto como las antocianinas como los copigmentos tienen forma casi plana con electrones  $\pi$ , lo que propicia la formación de complejos que ayudan a proteger el núcleo flavilo rojo del ataque nucleofílico del agua (una de las causas de inestabilidad de los compuestos antociánicos), de igual manera, la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo carbonilo de la base quinoidal de las antocianinas con el complejo, se considera un mecanismo para formación de complejo antocianina-copigmento (Rein, 2005).

### **2.5.1. Estructura química**

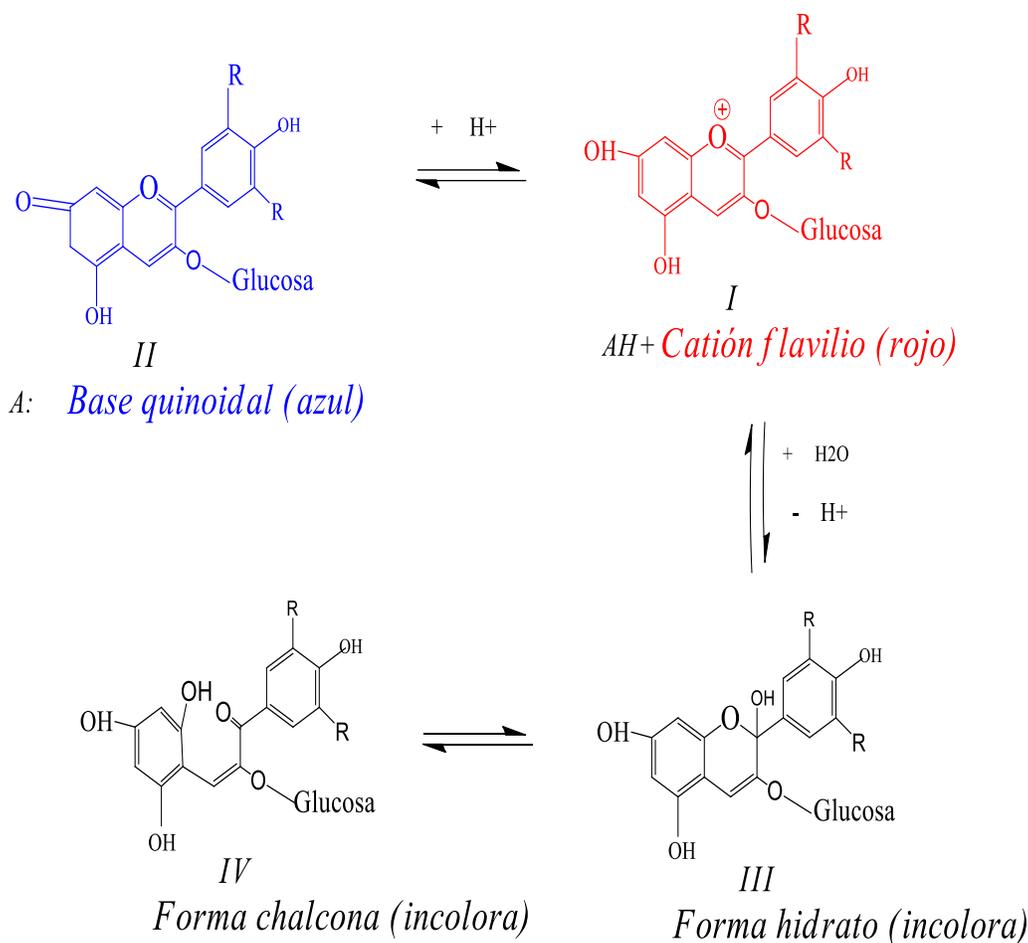
El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo en la molécula, los incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas y, además del color, la estructura molecular interviene en la estabilidad de las antocianinas, generalmente el incremento de hidroxilaciones decrece la estabilidad, mientras que un aumento de metilaciones

incrementa la estabilidad (Delgado y Paredes, 2003; Quintero, 2004; Garzón, 2008; Ortiz et al., 2011).

Las antocianinas como se ha mencionado en apartados anteriores pueden estar glucosiladas y aciladas, el azúcar en la molécula les brinda mayor solubilidad y estabilidad, en la naturaleza las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas generalmente en las posiciones 3 del grupo fenólico pero igual en las posiciones 5 y 7. Los monosacáridos glicosilantes más comunes son pentosas como la arabinosa y la xilosa; hexosas donde la D-glucosa es la más frecuente, aunque pueden estar presentes la ramnosa o galactosa, entre los disacáridos más comunes se encuentran la soforosa, gentobiosa, rutinosa y trisacáridos como la gentotriosa, xilosilrutinosa o glucosilrutinosa (Aguilera-Ortiz et al., 2011). Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos como pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzoico (Markakis, 1982; Mazza y Miniati, 1993), se ha observado que la presencia de éstos grupos acilos en la molécula de antocianidina le confiere estabilidad ante condiciones extremas de pH y temperatura (Salinas et al., 2010) referente con la literatura las antocianinas con grupos acilo aromático demuestran una mayor estabilidad a comparación de los pigmentos no acilados; los cuales se decoloran con rapidez por hidratación en la posición 2 del núcleo de la antocianidina. Así mismo, se reporta que la configuración  $\beta$  de la 3-D-glucosilación de malvidina, cianidina y delfinidina mejoraron sus estabilidades sobre la configuración  $\alpha$  (Stintzing et al., 2002).

### **2.5.2. Efecto del pH**

Debido a la deficiencia electrónica del catión flavilio (carga positiva), las antocianinas funcionan como verdaderos indicadores de pH, su color depende de las condiciones de alcalinidad del sistema en que encuentran (Guarnizo y Martínez, 2009). La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula (Garzón, 2008). A pH ácidos adquieren una estructura estable de catión flavilio (regularmente color rojo), representado en la Figura 8 (fórmula I), cuando se incrementa el pH, la estructura electrónica se modifica hasta llegar a la forma base quinoidal que se percibe con coloración azul (fórmula II), la hidratación del catión flavilio produce la base carbinol (fórmula III) que no absorbe luz, por lo tanto permanece incolora (Guarnizo y Martínez, 2009).

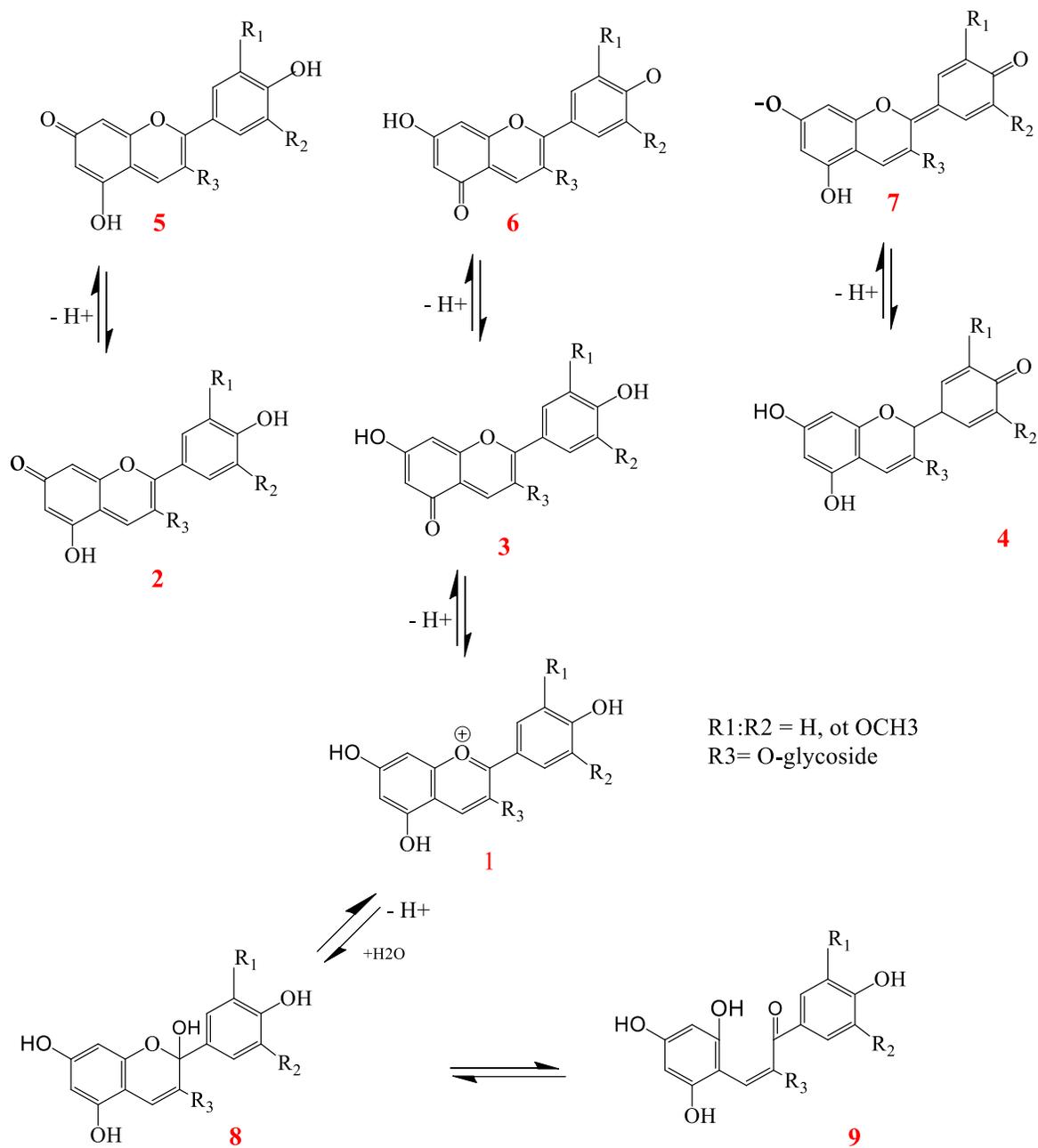


**Figura 8.** Efecto del pH en la estructura y la estabilidad de las antocianinas.

En la figura 9 se representa las modificaciones estructurales de las antocianinas que sufren dependiendo al pH del medio donde se encuentra disuelto, donde a valor de pH por debajo de 2 las antocianinas existen principalmente en forma de cationes rojos de flavilio (1), solvatación de una sal de flavilio en un ambiente acuoso ligeramente ácido o neutro da como resultado la formación inmediata de las bases quinoides neutras con tonalidad púrpuras (2-4) o formando bases ionizadas azules (5-7). Sin embargo, los 3-glucósidos y 3,5-Los diglicósidos cambian más o menos rápidamente al más carbinol estable (8) y pseudobases de calcona (9), estos dos últimos incoloros (Brouillard (1988) citado por Dao, Takeoka, Edwards, y Berrios, (1998).

Por lo tanto, una limitante del uso de colorantes basados en antocianinas es la reducción de su intensidad del color rojo por el incremento del pH dando lugar a tonalidades azules y la producción

de formas quinoidal y hemiacetal azules o incoloras, menos estables y más fácil de degradarse (Baublis, Spomer y Beber-Jiménez, 1994; Cheynier, 1999; Francis, 1999).



**Figura 9.** Transformaciones estructurales de antocianinas en solución acuosa a pH variable.

### **2.5.3. Efecto de la temperatura**

La influencia de la temperatura ha sido estudiada por su importancia en la calidad e inocuidad de los alimentos, se ha observado que las altas temperaturas influyen en la disminución de los pigmentos; en la degradación térmica de las antocianinas en extractos, así como en sistemas modelos se reporta que siguen la cinética de primer orden (logarítmica) entre la temperatura y la destrucción de las antocianinas durante un tiempo de calentamiento a una temperatura constante (Mercadante y Bobbio, 2008). El incremento de la temperatura ocasiona la pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras (Timberlake, 1980). De acuerdo con la literatura, las antocianinas altamente hidroxiladas son menos estables térmicamente que las metiladas, glicosidadas o acetiladas (Fennema, 2000).

### **2.5.4 Efecto de la presencia de azúcares**

Cuando los azúcares se encuentran a altas concentraciones, el valor de la actividad de agua ( $a_w$ ) es baja, por lo que, las moléculas de agua tienen menores posibilidades de atacar el catión flavilio para formar la base carbinol. Sin embargo, cuando los azúcares están en bajas concentraciones la actividad de agua no se ve afectada, por lo que sus productos de degradación (hidroximetilfurfural y furfural) aceleran la degradación de las antocianinas (Kopjar y Piližota, 2009; Lewis y Walker, 1995).

### **2.5.5 Actividad de agua ( $a_w$ )**

La actividad de agua se ha utilizado para evaluar el crecimiento microbiano, la oxidación de lípidos y la actividad no enzimática y enzimática después de la fabricación de productos alimenticios. El efecto del agua sobre las reacciones químicas en los alimentos ya sea enzimática o no enzimática, es difícil de atribuir a un único mecanismo, porque los mecanismos de reacción son complejos (Sablani, Kasapis, y Rahman, 2007). El agua libre es la que da origen al término actividad de agua ( $a_w$ ) y es con base a este parámetro, y no del contenido total de agua, se puede predecir la estabilidad y la vida útil de un producto (Barbosa-Cánovas, Fontana, Schmidt y Labuza, 2007; Chinachoti, 2000).

La actividad de agua influye en la degradación de los pigmentos como las antocianinas, afecta la velocidad del oscurecimiento no enzimático, aún cuando cada azúcar tiene un distinto poder reductor y, en consecuencia, influye de manera diferente (Badui, 2013).

Varios autores han estudiado el efecto de la actividad del agua o el contenido de agua sobre la degradación de antocianinas en una variedad de alimentos y sistemas modelo e informaron que las antocianinas se degradan más rápidamente con el aumento de la actividad de agua. La energía de activación, y la temperatura requerida se reducen al ir aumentando la actividad de agua (Badui, 2013).

Los cambios en el contenido de las antocianinas expuestos a diferentes valores de  $a_w$  se puede determinar mediante la cinética de primer orden para todos los niveles  $a_w$  y pigmentos probados. Una reacción de primer orden es descrita por la ecuación:

$$\frac{C}{C_0} = \exp(-kt) \quad (1)$$

Donde C = concentración de pigmento en un tiempo t;  $C_0$  = concentración inicial de pigmento; k = constante de velocidad de reacción; t = tiempo

Por tanto, el modelo de regresión lineal es la siguiente:

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = -\beta_1(\text{tiempo}) + \beta_0 \quad (2)$$

Donde C /  $C_0$  = concentración monomérica de antocianinas en cualquier tiempo / concentración inicial monomérica de antocianinas,  $\beta_0$  = intersección, y  $\beta_1$  = pendiente.

### **2.5.6 Luz**

Las antocianinas generalmente presentan inestabilidad cuando son expuestas a luz UV o visible, este factor puede generar un estado excitado en la antocianina lo que conlleva a la descomposición química. Se ha observado que la sustitución del hidroxilo en el carbono 5 hace que la antocianina sea más vulnerable a la fotodegradación cuando ésta se presenta con flavonas polihidroxiladas, isoflavonas y auronas sulfonadas (Delgado-Vargas et al., 2000).

Se ha reportado que la luz influye en la degradación de las antocianinas durante el almacenamiento en extractos de camote morado y rábano (Rojas, 2014).

### **2.5.7 Ácido ascórbico**

El mecanismo propuesto por Jurd (1972) y modificado por Poesi-Langston (1981) y Wrolstad (2002) referente a la degradación de antocianinas en presencia de ácido ascórbico consistió en una

condensación directa de ácido ascórbico sobre el carbono 4 de la molécula de antocianina, causando la pérdida de ambos, no obstante, con la adición de flavonol se ha demostrado que se produce un efecto protector de las antocianinas ante el ácido ascórbico (Shrikhande y Francis, 1974).

### **2.5.8 Oxígeno.**

La oxidación de las antocianinas puede darse de manera directa con el oxígeno o indirecta mediante reacciones con otros compuestos oxidados dando lugar a productos incoloros o pardos como el peróxido de hidrógeno, que actúa rompiendo el anillo de pirilio de la antocianina por un ataque nucleofílico en el carbono 2 produciendo ésteres incoloros y derivados de la cumarina. Estos productos de degradación son totalmente destruidos y polimerizados para formar precipitados de color marrón (Fennema, 2000). Los mecanismos de oxidación en las antocianinas se ven favorecidos al aumentar la temperatura (Rein, 2005). También se ha observado que, en presencia de oxígeno, el ácido ascórbico destruye a las antocianinas dando a lugar a peróxido de hidrógeno; esta reacción se acelera con la presencia de cobre y puede ser inhibida en presencia de flavonoles como la quercetina (Zapata, 2014).

### **2.5.9 Otros factores**

Además de la temperatura y del pH, las antocianinas son compuestos inestables en presencia de iones monovalentes como el sodio, el potasio o bien con iones divalentes como el calcio y el magnesio. De igual manera, las antocianinas tienden a ser inestable en presencia de ácido ascórbico y de enzimas como la  $\beta$ -glucosidasa que hidroliza el enlace glucosídico en el carbono 3 (C-3) produciendo la correspondiente aglicona, que es incoloro y es el más inestable que la antocianina de donde proviene, por lo tanto, su degradación es más rápida (Garibay et al., 1993; Badui, 2013).

## **2.6 Extracción de antocianinas**

No se ha establecido un procedimiento definitivo para la recolección y almacenamiento de las muestras previo al proceso de extracción de antocianinas, sin embargo, se recomienda el secado, el liofilizado; la congelación y la protección frente a la luz (Tura y Robards, 2002).

La extracción representa una etapa importante en el aislamiento, identificación y utilización de las antocianinas de productos vegetales. Tradicionalmente los métodos de extracción de antocianinas

incluyen el remojo, la agitación, la extracción enzimática, la extracción por ultrasonido, entre los cuales la extracción por disolvente ha sido el método más común para el estudio de diversos compuestos que se encuentran en las frutas, incluyendo flavonoides. Las antocianinas son moléculas polares, por tanto, los disolventes más comunes utilizados en las extracciones son mezclas acuosas de etanol, metanol o acetona (Kähkönen, Hopia, y Heinonen, 2001). Estas metodologías implican la co-extracción de sustancias no fenólicas tales como azúcares, ácidos orgánicos y proteínas que requieren procesos de purificación posteriores.

Dado que las antocianinas son más estables bajo condiciones ácidas, valores de pH superiores a 7 conducen a su degradación (Castañeda-Ovando et al., 2009; Fleschhut et al., 2006; Seeram et al., 2001) esto justifica la mayoría de los protocolos de extracción requiere la presencia de un ambiente acidificado, el cuidado del pH se mantiene como una variable de extracción relevante con un impacto considerable sobre la cantidad de las antocianinas extraídas.

Entre los métodos más comunes son los que utilizan metanol o etanol acidificado (Amr y Al-Tamimi, 2007; Awika, Rooney y Waniska, 2005; Cacace y Mazza, 2003; Donner, Gao, y Mazza, 1997; Fossen y Andersen 2003; Phippen y Simon, 1998). De estos métodos, la extracción con metanol es el eficiente (Kapasakalidis, Rastall y Gordon, 2006); sin embargo, en la industria alimentaria se prefiere el etanol (70%) y agua debido a la toxicidad que puede presentar el metanol. El remojo también se ha utilizado ampliamente para la extracción de las antocianinas; en la industria del vino es el método más recurrente que consiste en moler la fruta fresca y poniendo en contacto el mosto con los hollejos para extraer los pigmentos (Ella Missang, Guyot y Renard, 2003).

De acuerdo con los métodos de extracción descritos en la bibliografía, se puede observar que con el fin de extraer antocianinas aciladas y 3,5-diglucósido es necesario utilizar medios con ácidos débiles para evitar su hidrólisis (fórmico o ácido acético); cuando se utiliza HCl 0.1% en MeOH se pueden extraer agliconas, pero en estas condiciones no es posible saber si las agliconas estaban contenidas en la muestra o si la hidrólisis se produjo durante la extracción. Se ha evidenciado que cuando se utiliza medios con acidez baja se puede mejorar la eficiencia de extracción y la obtención de una gran diversidad estructural de antocianinas (metanol con ácido trifluoroacético y metanol: ácido fórmico: agua) (Castañeda-Ovando et al., 2009).

La temperatura es un factor determinante de la eficiencia de extracción de antocianinas y se relaciona al tipo de matriz o tejido de la fuente alimentaria de interés, por ejemplo, en pieles más

blandas como en las moras un calentamiento a 90 °C una reducción del 80% de la vida media de las antocianinas (Wang y Xu, 2007), sin embargo, en otras matrices alimentarias como son las papas azules altas temperaturas (80°C) incrementan la extracción.

Ante todo, lo anterior, los parámetros como el tipo de disolvente extracción y su composición, la relación líquido-sólido, el tiempo de extracción y la temperatura requieren optimización adecuada (Zou et al., 2011).

## 2.7 Estudios de la extracción de antocianinas a partir de subproductos vegetales

La extracción de los pigmentos antociánicos depende tanto de la matriz vegetal y el método empleado, para obtener mejores resultados en este proceso, factores como el solvente, la temperatura y el tiempo empleado deben definirse (Pinela, Barros et al., 2016; Pinela, Prieto, et al., 2016), en la Tabla 6 se presentan diversos estudios para la antocianinas de diversas fuentes, se puede observar el empleo de una optimización de las condiciones de extracción, donde los factores más sobresalientes son el tiempo, la temperatura y el solvente, referente a este último punto en los estudios se observó el uso del etanol como solvente de extracción, así mismo, mediante a los estudios se ha logrado la identificación y la evaluación de propiedades benéficas para la salud.

**Tabla 6**

*Estudio de extracción de antocianinas en diversas matrices vegetales*

Fuente	Disolvente	Condición óptima	Hallazgos	Referencia
Cáscara de berenjena ( <i>Solanum melongena</i> )	Etanol acidificado con ácido ortofosfórico.	Etanol 50%, 4 horas a 30° C.	Se detectó que la interacción tiempo de extracción y temperatura afectó la capacidad antioxidante de extractos de berenjena.	Heras, Alvis, y Arrazola (2013).
Cáscaras de fruta de <i>S. cumini</i>	Etanol, agua MilliQ, HCl, ácido cítrico ácido acético	20% de etanol con 1% de ácido acético	Con la aplicación de un modelo de regresión desarrollado por MSR se logró optimizar un sistema de disolvente y se obtuvo	Chaudhary y Mukhopadhyay (2013).

---

			alto rendimiento en la extracción de antocianinas.	
Alubias negras	Etanol en agua acidificada con 2%.	Relación sólido-líquido 1:40 24% de etanol en agua acidificada (2% de ácido fórmico). Temperatura:29 ° C, Tiempo 2 h.	Las alubias negras demostraron ser una buena fuente para la extracción de antocianinas con potencial antidiabético.	Mojica, Berhow y de Mejia (2017).
Arroz morado y negro ( <i>Oryza sativa L.</i> )	Etanol	Arroz morado: 31.7 °C, 15.77 min, Etanol 31.17 % y pH : 2.39  Arroz negro : 35.97° C, pH 2.52, etanol al 23.73 % 22.84 min	Se reportó un mayor contenido de antocianinas en el extracto de salvado de arroz morado que en el extracto de salvado de arroz negro.  El proceso extracción asistida por ultrasonido desarrollado mostró una mayor eficiencia que el proceso convencional.	Das, Goud, y Das, (2017).

---

## **2.8 Metodología de superficies de respuesta**

La MSR es una estrategia experimental para determinar las condiciones de operación óptimas de un proceso, es decir aquellas que dan por resultado “valores óptimos” (Gutiérrez Pulido y Vara Salazar, 2008).

### **2.8.1. Diseño con superficie de respuesta**

La superficie de respuesta facilita la inspección visual de la respuesta para cierta zona de los niveles de los factores de interés y evaluar su sensibilidad a los factores de tratamiento. En ciertas aplicaciones industriales, las superficies de respuesta se exploran para determinar la combinación de niveles de los factores que proporcionan una condición operativa óptima, como la combinación de temperatura y tiempo que maximiza la producción química. Las superficies de respuesta también se pueden utilizar en estudios analíticos de procesos fundamentales; por ejemplo, suelen usarse en las ciencias biológicas para investigar la influencia mutua de los factores sobre la variable de respuesta, como la interacción entre el nitrógeno y el fósforo en el crecimiento de las plantas (Kuehl, 2001).

### **2.8.2. El diseño central compuesto como herramienta en la optimización**

El diseño de composición central (DCC) es el más usado en la etapa de búsqueda de segundo orden debido a su flexibilidad, se puede construir a partir de un diseño factorial completo  $2^K$  o fraccionado  $2^{k-p}$  agregando puntos sobre los ejes y al centro. Este diseño se compone de tres tipos de puntos:

1. Una réplica de un diseño factorial en dos niveles, completo o fraccionado. A esta parte DCC se le llama porción factorial.
2.  $n_0$  puntos o repeticiones al centro del diseño, con  $n_0 \geq 1$ .
3. Dos puntos sobre cada eje a una distancia  $\alpha$  al origen. Estos puntos se llaman porción axial.

### **2.8.3. Diseño de composición central con centro en las caras**

En este los puntos axiales se localizan en el centro de las caras, es decir,  $\alpha = 1$ . Esta variante es útil cuando ya se corrió el diseño  $2^K$  y se requiere completar un DCC, pero se complica correr los tratamientos con niveles más allá de los valores -1 y +1 debido a las restricciones del proceso (Gutiérrez Pulido y Vara Salazar, 2008).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

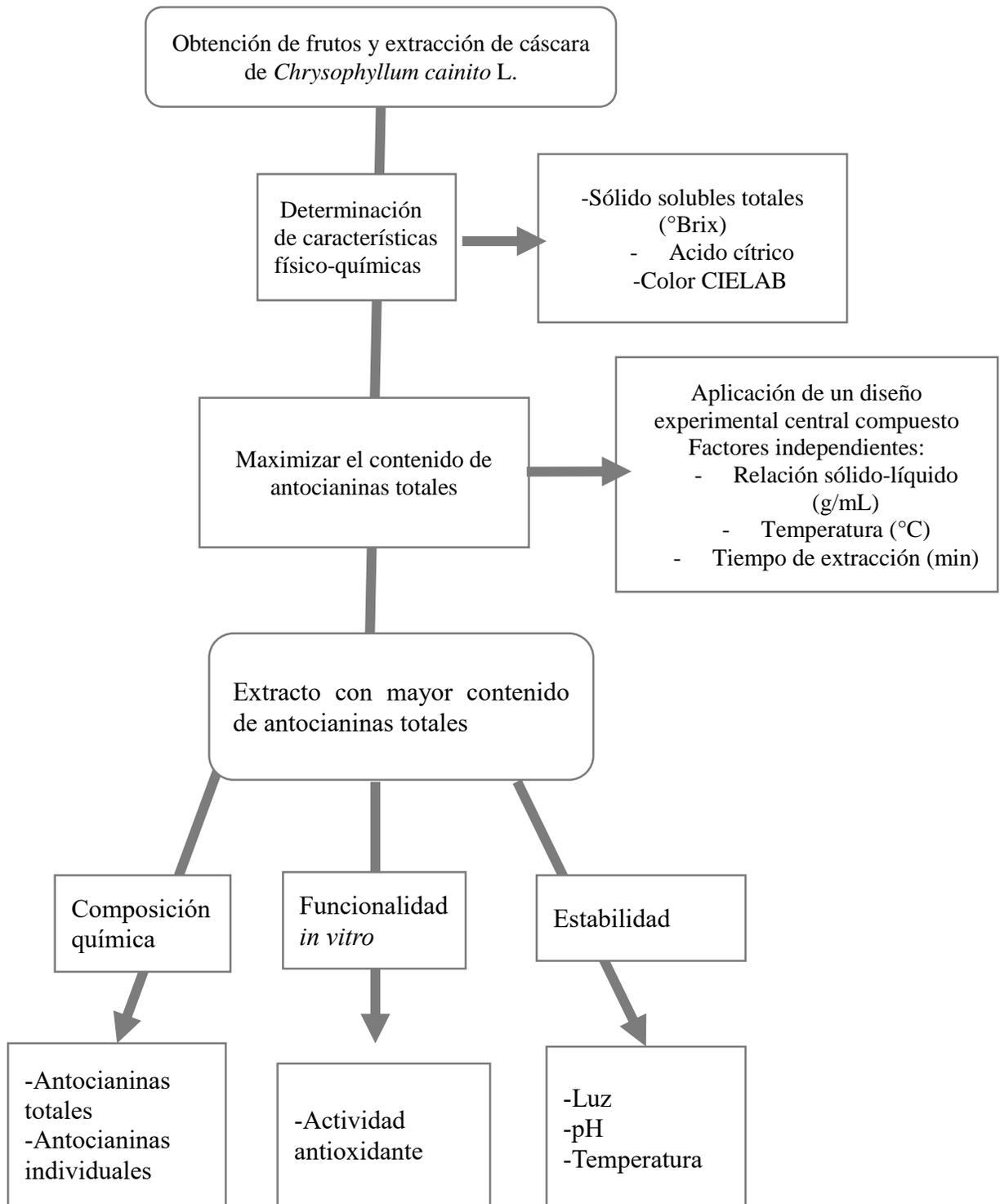
Extraer y caracterizar un extracto de antocianinas a partir de cáscara de *Chrysophyllum cainito* L y evaluar su estabilidad al pH, temperatura y luz.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Determinar algunas características físico-químicas de la pulpa y cáscara de *C. cainito*
- Determinar las condiciones de relación sólido-disolvente, temperatura y tiempo para la mayor extracción de antocianinas de la cáscara usando la metodología de superficies de respuesta.
- Caracterizar el extracto de antocianinas obtenido bajo condiciones previas mediante su contenido de Cianidina 3- glucósido por HPLC, compuestos fenólicos totales, antocianinas totales, índice de obscurecimiento, color polimérico y actividad antioxidante.
- Identificar la presencia de antocianinas individuales y polifenoles por HPLC-MS-QTOF en extracto de cáscara de *C. cainito* L.
- Evaluar la estabilidad del extracto de antocianinas de *C.cainito* L. expuesto a diferentes condiciones de pH, temperatura y luz.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Estrategia general de trabajo



Para lograr los objetivos planteados, fueron propuestos tres etapas de trabajo, en la primera se realizó la colecta de la fruta entre los meses de Marzo y Junio, posteriormente, se obtuvo la fracción no comestible (cáscara) de fruto de caimito morado; posteriormente, se evaluaron algunas características físico-químicas de la pulpa, que están relacionados con la maduración de la fruta tales como, la acidez titulable, sólidos solubles totales y color instrumental utilizando el sistema CIELAB. Dentro de esta misma etapa, se planteó una estrategia para maximizar la recuperación de antocianinas totales a partir de la cáscara bajo ciertas condiciones de extracción, a través de un diseño experimental central compuesto con la metodología de superficie de respuesta. Los factores independientes evaluados fueron la relación disolvente-polvo de cáscara, temperatura y tiempo de extracción. Después de maximizar la recuperación de antocianinas estableciendo los niveles de cada factor, se comparó el contenido de antocianinas totales entre los valores experimentales y valores predichos por el modelo. Esta información permite establecer un proceso de extracción de pigmentos antociánicos para el aprovechamiento de desperdicios de las frutas como la cáscara de *C. cainito* y dar un valor agregado como fuente de colorantes en alimentos y nutraceuticos.

En una segunda etapa, los extractos con mayor contenido de antocianinas totales fueron caracterizados mediante su perfil cromatográfico de antocianinas, actividad antioxidante y características de color. La última etapa correspondió a un estudio de estabilidad del extracto a través de los cambios en contenido de antocianinas observados en diferentes condiciones de pH, temperatura, y luz. La tercera etapa proporciona la base para definir cuáles condiciones son adecuadas para almacenar el extracto, manteniendo sus propiedades bioactivas.

## **4.2. Materia prima**

Los frutos de caimito variedad púrpura oscuro (*Chrysophyllum cainito* L.) fueron recolectados en la localidad de Calkiní, Campeche, entre los meses de Marzo y Junio de 2018.

La cáscara de los frutos fue retirada de manera manual, para luego ser cortadas en secciones de 0.5 cm y sometidas a liofilización empleando un equipo LABCONCO Freezone 1, operado a -42 °C, y 0.013 mBar durante un periodo de 72 h. Tras el secado por liofilización, las cáscaras fueron trituradas en una licuadora (Osterizer ®) hasta obtener un polvo fino. El polvo homogenizado fue distribuido al azar en dos lotes y almacenadas a -20°C en bolsas oscuras con cierre hermético.

### 4.3. Evaluación de algunas características físicoquímicas del fruto

#### 4.3.1. Sólidos solubles totales (SST) y Acidez total titulable (ATT).

Para la determinación del contenido de SST, se colocó una porción de pulpa homogeneizada en un refractómetro marca Atago Rx5000 y los resultados fueron expresados en °Brix.

El contenido de acidez titulable se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por la AOAC (AOAC, 1995), 5 g de pulpa homogeneizado fue aforado a 100 mL con agua destilada y filtrado con papel whatman No.1. 50 mL del filtrado fue titulado contra NaOH 0.1N utilizando fenolftaleína como indicador. El ácido cítrico fue utilizado como factor ácido (=0.064). ATT fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Acidez (\%)} = \frac{(T * V * N * 0.064) * 100}{M * P} \quad (3)$$

Donde: T = Volumen de NaOH utilizado (mL)

V=Volumen total de la mezcla en mL

N = Normalidad del NaOH.

0.064 = peso equivalente expresado en g de ácido cítrico.

M=Alícuota de mezcla en mL

P = peso en gramos de la muestra utilizada

#### 4.3.2 Determinación de color instrumental

El color fue medida sobre la superficie de la cáscara de *Chrysophyllum cainito* mediante un colorímetro Hunter Lab MiniScan EZ. Los resultados fueron expresados en el espacio de color CIE L\*, a\* y b\*, en donde, L\* corresponde a la luminosidad (blanco/negro), +a\* son tonos rojos y -a\* son tonos verdes; mientras que +b\* y -b\* son tonos amarillos y azules, respectivamente. Además, se obtuvo Chroma C\* y el ángulo Hue (h) con las siguientes fórmulas (McGuire, 1992):

$$h = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \quad (4)$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (5)$$

#### 4.4 Diseño experimental y análisis estadístico. Extracción de antocianinas

Un gramo de cáscara en polvo (liofilizado) fue extraído para antocianinas en etanol acuoso (70:30 % v/v en agua destilada) acidificado con HCl 1N (85:15, v/v) en una incubadora con agitación (600 rpm), a un tiempo, temperatura y relación líquido-sólido. **Después del tiempo de extracción, el extracto crudo fue** centrifugado a 3,500 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante con posterior almacenamiento -20°C en tubos protegidos de la luz hasta su análisis inmediato.

**DCC se utiliza ampliamente en el procesamiento de alimentos para optimizar un sistema complejo.** Para la optimización del proceso de extracción se aplicó el DCC, diseño central compuesto rotatable  $2^3$  con 8 puntos factoriales, 6 puntos axiales y 3 centrales, resultando en un total de 17 corridas experimentales (Tabla 7). **Las variables independientes evaluadas fueron temperatura, relación líquido-sólido y tiempo de extracción, mientras que la variable dependiente o de respuesta fue el contenido de antocianinas totales. La tabla 8 muestra los factores y los niveles analizados en el diseño DCC.** Los niveles de cada variable fueron establecidos de conforme a la información reportada en la literatura y en los ensayos preliminares. **Los datos fueron analizados utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR) con Design-Expert software versión 7.1.5. Los datos experimentales fueron ajustados a un modelo polinomial de segundo orden como muestra la siguiente ecuación 6 (Khuri y Cornell, 1996):**

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{\substack{j=2 \\ j>i}}^n b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2 \quad (6)$$

Donde Y es la variable dependiente (variable de respuesta),  $X_i$  and  $X_j$  definen las variables independientes,  $b_0$  es el coeficiente de regresión constante,  $b_i$  es el coeficiente de efecto lineal,  $b_{ij}$  es el coeficiente del efecto de la interacción,  $b_{ii}$  los coeficientes de efecto cuadrático y n es el número de variables.

**Tabla 7**

*Diseño experimental para el proceso de extracción de antocianinas a partir de cáscara de la fruta C. cainito*

Temperatura (°C)	Relación líquido- sólido (mL/g)	Tiempo (min)
25	25	30
45	25	30
25	65	30
45	65	30
25	25	100
45	25	100
25	65	100
45	65	100
18.1821	45	65
51.8179	45	65
35	11.3641	65
35	78.6359	65
35	45	6.13725
35	45	123.863
35	45	65
35	45	65
35	45	65

**Tabla 8***Factores y los niveles analizados en el diseño DCC*

Variables independientes	Variables con sus niveles codificados					
		-1.68	-1	0	1	1.68
Temperatura (°C)	$X_1$	18.1	25	35	45	51,8
Relación líquido- sólido (mL/g)	$X_2$	11.3	25	45	65	78.6
Tiempo (min)	$X_3$	6.1	30	65	100	123.8

El esquema del diseño experimental real se muestra en la Tabla 8. El valor mínimo y el máximo de cada variable es codificado como  $-\alpha$  (-1.682) y  $+\alpha$  (1.682), respectivamente. El valor codificado como 0 representa valores centrales de la variable y se repite por el error experimental, los puntos factoriales son codificados como  $\pm 1$ .

El diseño central compuesto está diseñado para estimar los coeficientes de un modelo cuadrático. Para obtener la mejor superficie de respuesta, CCDs rotatable son comúnmente aplicados, dicha rotabilidad implica que la variación de la predicción de la respuesta puede ser constante a una distancia dada a partir del centro de diseño.

El análisis de varianza (ANOVA), la determinación de los coeficientes de regresión y la construcción de gráficos tridimensionales se realizaron utilizando el software **Design-Expert software versión 7.1.5**. La adecuación y calidad de ajuste fue evaluado por la prueba de falta de ajuste y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). El proceso de extracción se optimizó mediante MSR con el objetivo de lograr el mayor contenido de antocianinas totales.

#### 4.5 Obtención de extracto de antocianinas (EAO) mediante el proceso de extracción optimizado

Un gramo de polvo liofilizado de cáscara se mezcló con 64.61 mL de etanol (70 % v/v, en agua destilada) acidificado con HCl 1N (85:15, v/v), la extracción se realizó controlando una temperatura de 44.77 °C durante 93.58 min, con agitación constante. El extracto antociánico fue centrifugado a 3,500 rpm durante 15 min a 25°C, el sobrenadante fue recuperado y almacenado a -20°C en tubos protegidos de la luz.

#### 4.6. Caracterización del extracto de antocianinas (EAO)

##### 4.6.1. Determinación de antocianinas totales

La concentración de antocianinas totales se determinó por el método de pH diferencial reportada por Giuti y Wroslad (2001), donde la antocianina experimenta una transformación reversible en función del pH manifestado por cambio en la absorbancia, la forma oxonium predomina a pH 1 y el hemiacetal a pH 4.5 (Paulino, 2017). Empleando dos sistemas de buffer: cloruro de potasio (pH 1.0) y de acetato de sodio a (pH 4.5). Alícuota de 500µL del extracto fue diluido en 4.5 mL de respectivas soluciones buffer, obteniendo un volumen final de 5 mL en cada muestra. Las muestras se dejaron en reposo durante 15 minutos a 25°C protegidas de la luz, posteriormente, se realizó la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Technologies Cary 60 a las longitudes de onda de 520 y 700 nm, empleando agua destilada como blanco.

Para el cálculo de concentración de antocianinas monoméricas se empleó la ecuación 7.

$$\text{Antocianinas monoméricas} : \frac{(A)(PM)(FD)(1000)(V)}{(\epsilon)(l)(P)} \quad (7)$$

Donde:

A= Absorbancia

PM= peso molecular (449.2 g/mol correspondiente a la cianidina 3 glucósido)

FD= Factor de dilución (relación entre el volumen total y volumen de alícuota adicionado al buffer).

$\epsilon$  =Coeficiente de extinción molar (26,900 L\* $\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para cianidina 3 glucósido)

V= volumen total de extracto en L.

P=Peso de polvo seco (g)

El valor final de la absorbancia se obtuvo aplicando la fórmula 5

$$A = (A_{\text{max}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1} - (A_{\text{max}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5}$$

A max = Absorbancia mayor obtenida a pH 1 y pH 4.5 (520 nm)

A 700= Lectura a 700 nm a pH 1 y pH 4.5.

l=Ancho de la celda en cm

Los resultados fueron expresados en mg equivalentes a cianidina-3-glucósido/g de polvo seco PS.

#### **4.6.2. Compuestos fenólicos solubles totales**

El contenido de fenoles solubles totales se determinó de acuerdo con el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi (1965), modificado por Gonzales-Aguilar et al. (2007) donde el extracto de antocianinas de la cáscara *C. cainito* fue diluido con un factor de 20 veces con el disolvente de extracción, tomando alícuotas de 50 µl fueron mezclados con 3 mL de agua destilada más 250 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (1N). Se permite que la mezcla alcance el equilibrio por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 750 µl de solución de carbonato de sodio (20%, p/v en agua destilada) más 950 µl de agua destilada. Tras la incubación de la mezcla por 30 min se mide la absorbancia de la solución a 765 nm contra un blanco del disolvente utilizado para la extracción con un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Technologies Cary 60. Los resultados fueron expresados como g equivalentes de ácido gálico (EAG) / 100 g de polvo seco. La curva de calibración se realizó con concentraciones entre 100 y 1000 ppm de ácido gálico.

#### **4.6.3 Determinación de la densidad del color y el color polimérico del extracto EAO**

Para la determinación de la densidad del color y el color polimérico de EAO, se utilizó el método de blanqueamiento desarrollado por Somers (1974), con ciertas modificaciones. Para la muestra blanqueada se emplearon 3 mL de extracto de antocianinas (diluido con FD =6 con el disolvente de extracción, con el fin de obtener una absorbancia menor a 1) mezclados con 200 µL de metabisulfito de sodio al 20 % (p/v, en agua destilada), por su parte, para la muestra control (no blanqueada) se agregaron 200 µL de agua destilada en lugar del metabisulfito de sodio. Las lecturas de absorbancias fueron realizadas en ambas muestras (control y blanqueadas), contra un blanco de

agua destilada, a 420 nm ( $\lambda$  de detección de compuestos pardos) y a 520 nm ( $\lambda$  máxima de la antocianina) mediante un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Technologies Cary 60.

La densidad de color se determinó en el extracto no blanqueado, considerando el factor de dilución FD y la sumatoria de la absorbancia a 420 nm y 520 nm. La turbidez (sustancias interferentes) se corrigió restando la absorbancia a 700 nm en este caso el valor fue 0.

$$\text{Densidad de color} = [(A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) + (A_{420\text{nm}} - A_{700\text{nm}})] * FD \quad (8)$$

El color polimérico se calculó acorde al mismo procedimiento anterior, pero en este caso, considerando la muestra tratada con metabisulfito (muestra blanqueada).

$$\text{Color polimérico} = [(A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) + (A_{420\text{nm}} - A_{700\text{nm}})] * FD \quad (9)$$

El porcentaje de contribución de taninos (color debido al material copolimerizado) al color total se puede determinar a partir de la densidad del color y el polímero color.

$$\% \text{ contribución de taninos} = \frac{\text{color polimérico}}{\text{densidad de color}} \times 100 \quad (10)$$

Finalmente, el índice de oscurecimiento se determinó con la siguiente ecuación (Wrolstad, 1993):

$$IO = \frac{Abs \ 520}{Abs \ 420} \quad (11)$$

Donde :

IO= índice de oscurecimiento.

Abs 520= absorbancia a 520 nm ( $\lambda$  máxima de la antocianina).

Abs 420= absorbancia a 420 nm ( $\lambda$  máxima de los compuestos pardos).

#### **4.6.4 Actividad antioxidante**

##### **4.6.4.1 Método ABTS**

El ensayo de ABTS se llevó a cabo según Miller et al. (1993). El catión ABTS<sup>•+</sup> (Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) se obtuvo mezclando 19.2 mg de ABTS<sup>•+</sup> con 5 mL de agua destilada y 88  $\mu$ L de persulfato de potasio (0.0378g/mL). La solución fue incubada en la

obscuridad a temperatura ambiente durante 16 -18 h. Una alícuota de 1 mL de la solución anterior de ABTS•+ se diluyó en 100 mL de etanol (96%). El radical se ajustó a una absorbancia de  $0.7 \pm 0.2$  a 734 nm. Para la preparación de la reacción se mezcló 30  $\mu$ L de extracto de antocianinas con 2,970  $\mu$ l de la solución ABTS•+ ajustado. Tras ajustar el blanco con etanol, se tomaron lecturas con un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Technologies Cary 60 a 734 nm. La disminución de la absorbancia a 734 nm se medirá hasta que las variaciones de absorbancia este en torno a 0.003/minuto, lo cual indicaría que la reacción se ha completado (Schlesier et al., 2002). El resultado se expresó como mM equivalente a trolox (ET)/100 mL de muestra usando una curva de calibración con patrones de trolox con concentraciones entre 0 y 60  $\mu$ M ET/mL.

#### **4.6.4.2. Poder Reductor**

La evaluación del poder reductor del ion férrico ( $Fe^{3+}$ ) se determinó mediante la metodología de Oyaizu (1986), el extracto de antocianina se diluyó 50 veces utilizando el disolvente de extracción. 2.5 mL de extracto de antocianinas se mezcló con 2.5 ml de buffer de fosfato (0.2 M, pH 6.6) y 2.5 ml de ferricianuro de potasio (1% v/v,  $H_2O$ ). Después de un período de incubación de 20 min (55  $^{\circ}C$ ), la mezcla reaccionante se le adicionaron 2.5 mL de ácido tricloroacético (10% v/v,  $H_2O$ ) y se homogenizó con un vórtex. De esta solución se tomaron 5 ml y se mezclaron con 5 ml de agua destilada. Posteriormente, se agregaron 1 mL cloruro férrico (0.1% v/v,  $H_2O$ ), el cual se dejaron reposar por 10 min en obscuridad a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 700 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Agilent Technologies Cary 60. El incremento de esta variable da a entender un aumento en el poder reductor de los extractos. El resultado fue expresado mg equivalente a ácido ascórbico/100 mL extracto.

#### **4.6.5 Identificación y cuantificación de antocianinas individuales por HPLC**

La identificación de las antocianinas fue realizada de acuerdo al método establecido por Collison et al. (2015), con un sistema HPLC Thermo Scientific, modelo Dionex Ultimate 3000. 4 mL de extracto EAO se filtraron con filtros Millipore de 0.45  $\mu$ m (GMF, Whatman) previo a su inyección. Los extractos se analizaron con las siguientes condiciones cromatográficas: columna Eclipse XDB (C18 4.6  $\mu$ m x 250 mm). Se utilizó para la separación una temperatura de columna de 40  $^{\circ}C$ , los compuestos fueron monitoreados a 520 nm para las antocianinas y para otros compuestos fenólicos se monitorearon a 280, 320 y 360 nm.; velocidad de flujo de 0.5 mL/min; el volumen de inyección

de 50 µL; la fase móvil A: ácido fórmico 2 % en agua HPLC (2:98, v / v) y fase B, ácido fórmico al 2% en acetonitrilo/ metanol (50:50,v/v) grado HPLC. El gradiente de elución fue 0-2 min 90% de A y 10% de B, 4 min 80% de A y 20 % de B, 24-28 min 50% de A y 50% de B, 30-40 min 90% de A y 10% de B.

Para la cuantificación, el resultado fue expresado como mg equivalentes a Cianidina 3-glucósido/100 mL de extracto y mg/100 g de polvo de seco, mediante una curva de calibración con concentraciones conocidas de 2, 5, 10, 20 y 30 ppm de Cianidina 3-glucósido.

#### **4.6.6 Identificación de antocianinas y compuestos fenólico por HPLC-MS-QTOF**

Para la confirmación de los compuestos se empleó un acoplamiento de un equipo de Cromatografía de alta resolución con Espectrómetro de Masas Cuadrupolo-Tiempo de vuelo (HPLC-MS-QTOF): Cromatógrafo de Líquidos Agilent 1200, Detector Diodo Array G1315B. La columna usada fue Luna C18 (3µm ,150 mm x 4.6 mm), espectrómetro de Masas QTOF Agilent G6530A Accurate Mass Q-TOF LCMS con fuente de ionización a presión atmosférica electrospray (ESI) con tecnología JetStream. Estado del instrumento: rango dinámico extendido, 1700 m / z, las fases empleadas fueron Fase A: Agua 0.1% fórmico; Fase B: Acetonitrilo 0.1% fórmico, con un flujo de 0.5 mL/min.

El gradiente de elución fue el siguiente: 1-30 min 70% de A y 30% de B, 35 min 65% de A y 35% de B , 40 min 55% de A y 45% de B , 50-60 min 90% de A y 10% de B.

### **4.7 Estabilidad del extracto EAO**

#### **4.7.1 Estabilidad del extracto EAO expuesto diferentes pH's y al almacenado a 4°C y 25 °C**

El estudio de estabilidad del extracto de antocianinas de la cáscara *Chrysophyllum cainito* L., fue realizado en base al procedimiento descrito por Mojica et al. (2017) con algunas modificaciones. Se emplearon tres diferentes pH ajustados con NaOH (4M), los valores de pH se tomaron referentes a bebidas comerciales: pH 2.5 (soda), 3.0 (bebida carbonatada) y 4.3 (té helado), y dos temperaturas de almacenamiento (4°C y 25 °C). El volumen final de cada muestra fue de 21 mL, que fueron depositados en envases de vidrio estériles con tapa y protegidos de la luz, posteriormente se realizó la medición de antocianinas totales por pH diferencial; en los tratamientos almacenados a 4 °C, el monitoreo se realizó a 0, 7, 14, 21, 28 y 35 días, con una duración total de 5 semanas; mientras que

los tratamientos almacenados a 25 °C, las muestras fueron monitoreadas a 0, 0.5, 1, 2, 3 y 4 días. Adicionalmente de la medición del contenido de las antocianinas totales por pH diferencial, fue medido el cambio de color de los extractos.

#### **4.7.2 Estudio de estabilidad de antocianinas ante la luz**

El estudio de estabilidad del extracto de antocianinas de la cáscara expuesto a la luz, fue realizado ajustando el pH del extracto a un valor de 4.3 (simulando el valor de pH de un té helado), debido a que éste valor de pH del extracto resultó en mayor estabilidad y fue almacenado a 25°C. El volumen de cada muestra fue 60 mL, las muestras control (sin exposición a la luz) fueron almacenados en obscuridad y cerrados herméticamente; por otro lado, las muestras expuestas a la luz se emplearon dos lámparas de 20 W en posición paralela a una distancia de 20 cm entre ellas. El color y el contenido de las antocianinas totales fue monitoreado cada 12 h.

### **4.8. Cinética química**

#### **4.8. 1. Cinética química en la degradación de antocianinas**

El valor de la constante velocidad de degradación ( $k$ ) se obtuvo a partir de la pendiente de la curva, que representa la variación de la concentración de las antocianinas en función del tiempo (ecuación 10) (Zapata et al., 2016):

$$C = C_0 * e^{-kt} \rightarrow \ln = \ln C_0 - k * t \quad (12)$$

Donde :

C= Contenido de antocianinas al tiempo ( $t$ ),  $C_0$  = Contenido de antocianinas al inicio del almacenamiento,  $t$ =días,  $k$ = constante de degradación.

El tiempo de vida media ( $t_2^1$ ) de las antocianinas fue calculado con la ecuación de Arrhenius de primer orden (Harbourne et al., 2008; Ozela et al., 2007):

$$t_2^1 = \frac{\ln(2)}{k} \quad (13)$$

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Características fisicoquímicas del fruto

En la Tabla 9 se presentan los valores de obtenidos de algunas características fisicoquímicas del fruto de variedad caimito morado. El contenido de Sólidos Solubles Totales (SST), es decir, el cociente total de azúcar que se encuentra disuelta en el fruto, el caimito morado presentó un valor promedio de  $18.86 \pm 0.00$  °Brix. Diversos autores han reportado el contenido de SST del fruto de caimito, por ejemplo, Álvarez-Vargas et al. (2006) reportan valores de 11.7 °Brix en colectas del fruto recolectados en el estado de Morelos. Por su parte, Moo-Huchin et al. (2014) reportaron valores de 11.8 °Brix. Lema et al. (2017), obtuvo valores en un rango entre 14.07 y 15.25 °Brix. Los valores reportados por estos autores son inferiores a los del presente trabajo; esta diferencia se podría atribuir a los factores climáticos, grado de madurez del fruto, cultivo y la cosecha del fruto. Los valores altos de SST en una fruta indican mayor probabilidad de aceptación por el consumidor, debido a la relación con mayores niveles de azúcar y ácidos orgánicos (de Souza, Pereira, Queiroz, Borges, y Carneiro, 2012).

Respecto a la acidez titulable un valor promedio de  $0.28 \pm 0.01$  g de ácido cítrico /100 g de pulpa). Se han reportado valores de acidez titulable entre 0.17 y 1.52 % (Álvarez-Vargas et al., 2006; Lema et al., 2017), la existencia de variaciones puede ser conferido por la ubicación y la cantidad de agua disponible en cada región.

Por otra parte, la maduración de un fruto es un proceso de desarrollo de cambios bioquímicos, programado genéticamente que conduce al ablandamiento de los tejidos, cambios de sabor, color, olor y la reducción de la astringencia del fruto, esto a consecuencia de las reacciones de hidrólisis de los carbohidratos (almidón y pectinas) presentes en el estado inmaduro de la fruta, reduciéndose a azúcares mas simples y ácidos pécticos (Gallo, 1996; Parra y Hernández, 2005). El índice de madurez es un parámetro indirecto determinado a partir de la cuantificación del contenido SST y la acidez valorable, su importancia es grande, ya que puede ser un indicativo bastante preciso para determinar la calidad organoléptica de frutos, es decir, conociendo su valor, podemos estimar el sabor de un determinado fruto (Domene y Rodríguez, 2014). El valor promedio de la relación °brix/acidez titulable en caimito resultó en  $63.17 \pm 6.73$ , no obstante, en un árbol como el caimito no todos los frutos maduran al mismo tiempo y el índice de cosecha es difícil de establecer, sin embargo, cuando la fruta de caimito no está madura presenta un sabor astringente y gomoso, así como un látex pegajoso, que hace que la fruta no sea comestible, sin embargo, las frutas maduras

presentan una piel opaca (color púrpura pálido a oscuro) y suave (Morton, 1987; OFI-CATIE, 2010). Para este estudio se emplearon frutos en fase de madurez comercial de los productores de acuerdo con Álvarez-Vargas et al. (2006), esto es cuando se tiene más de 75 % de coloración morada en el fruto.

El análisis de color se basó el sistema CIELAB, en donde  $L^*$  indica la luminosidad, en otros términos, es el grado entre la oscuridad (0) y el brillo máximo (100), cuyo valor promedio fue de  $25.85 \pm 0.43$ , lo cual representa un cierto grado de oscuridad, que es representativo en la variedad de caimito con cáscara morada. En las coordenadas cromáticas:  $a^*$  toma valores positivos para colores rojizos y valores negativos para colores verdosos, mientras que  $b^*$  valores positivos para colores amarillos y valores negativos para azules (Granato y Masson, 2010). En la fruta analizada, el valor del color  $a^*$  fue de  $1.9 \pm 0.49$  correspondiente a colores rojos y  $b^*$  de  $-1.5$  equivalente a colores azules. La cromaticidad ( $C^*$ ) o la saturación es considerado un atributo cuantitativo de coloración, empleado para determinar la diferencia de un tono en comparación con un color gris con la misma iluminación, cuanto más altos sean los valores de  $C^*$  mayor es la intensidad de los colores de la muestra percibida por los humanos (Pathare et al., 2013). En la cáscara de la fruta, el valor de la cromaticidad fue de  $2.44 \pm 0.35$ , un valor bajo de este parámetro indica opacidad en la cáscara, la cual es representativa en la madurez del fruto de caimito en su variedad morada (Williams y Benkeblia, 2018). El tono ( $^{\circ}$ hue) es característico por la longitud de onda de la radiación y hace diferente a un color de otro un ángulo de  $0^{\circ}$  o  $360^{\circ}$  representa un tono rojo, ángulos de 90, 190, 270 representan amarillo, verde y azul respectivamente. En el caimito morado en valor fue de  $321.16 \pm 8.19^{\circ}$  representativo de tonalidades púrpuras-rojo (Jiménez-González, 2017).

**Tabla 9***Características fisicoquímicas del *Chrysophyllum cainito* L*

Característica	Valor promedio
Sólidos solubles totales (°Brix)	18.60±0.00
Acidez titulable (g de ácido cítrico / 100 g pulpa)	0.28±0.01
Ratio de madurez	63.17±4.25
L*	25.85±0.43
a*	1.9±.49
b*	-1.5±0.04
Tono (°hue)	321.16±8.19
Cromaticidad (C*)	2.44± 0.35

Nota: Los valores se expresan como promedio ± estándar (n = 6)

## 5.2 Obtención de parámetros para la optimización

En el presente estudio, se utilizó el diseño central compuesto rotatable para obtener un modelo preciso para la optimización del proceso de extracción de antocianinas a partir de cáscara de *C. cainito* L. Se utilizó la metodología de superficie de respuesta como técnica de modelado estadístico experimental para determinar la relación entre los resultados experimentales y los predichos.

Los experimentos de extracción se realizaron de acuerdo al diseño experimental con el propósito de obtener las condiciones óptimas y analizar la influencia de las variables del proceso de extracción sobre el contenido de antocianinas totales (Tabla 10). En dicha tabla se muestran los valores promedios del contenido de antocianinas totales, la cual varió de 2.09±0.11 hasta 3.06±0.11 mg cianidina 3 glucósido/g de polvo liofilizado. Estos valores reportados son superiores al contenido de antocianinas totales reportados para los frutos de *Syzygium malaccense* (Romualdo et al., 2021). Por otra parte, debido al carácter polar que pueden presentar las antocianinas al encontrarse naturalmente como glucósidos, para su extracción se usa solventes como metanol, etanol, acetona y agua, entre los cuales el metanol es el más usado por los altos rendimientos de extracción, sin embargo, en la industria alimentaria, los solventes comúnmente utilizados son el etanol y el agua,

debido a que no presentan toxicidad en comparación del metanol. En este estudio, fue empleado como solvente al etanol 70% acidificado con HCl (1N) en una relación 85:15 (v/v), respectivamente, esto con el objetivo de conservar el catión flavilio (color rojo) debido que el uso de solventes acidificados puede mejorar el proceso de extracción.

La extracción de los pigmentos antocianicos no solo depende de la matriz vegetal, sino también del método de extracción empleado, ante esto, se propuso investigar 3 variables de proceso de extracción de antocianinas tales como la relación líquido a sólido, temperatura y tiempo (Pinela et al., 2016). El rango de cada variable fue establecido en base a una investigación exploratoria e información de lo publicado recientemente.

Los datos experimentales fueron ajustados a modelos lineales, interactivos (2FI), cuadráticos y cúbicos; pero, el modelo cuadrático fue el mas adecuado para representar los datos experimentales, ya que los valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ), el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2$  ajustado) y el coeficiente de determinación predicho del modelo cuadrático fueron los más altos y significativos entre otros modelos (Tabla 11). Por tanto, se utilizó la siguiente ecuación polinomial de segundo orden con término de interacción para representar la relación entre factores independientes y respuestas en términos de factor codificado:

$$\begin{aligned} \text{Antocianinas} : & 2.81 + 0.032 * X_1 + 0.27 * X_2 + 0.0085 * X_3 - 0.021 * X_1^2 - 0.026 * X_1X_2 \\ & + 0.082 * X_1X_3 - 0.10 * X_2^2 + 0.059 * X_2X_3 - 0.011X_3^2 \end{aligned}$$

**Tabla 10***Contenido de antocianinas totales del extracto de la cáscara*

Número	<u>Temperatura</u>	<u>Relación líquido a</u>	<u>Tiempo</u>	AT (mg cianidina 3 glucósido/ g polvo liofilizado)
	$X_1(^{\circ}\text{C})$	<u>sólido</u> $X_2(\text{mL/g})$	$X_3(\text{min})$	
1	25	25	30	2.76±0.08
2	45	25	30	2.42±0.14
3	25	65	30	2.48±0.05
4	45	65	30	2.98±0.17
5	25	25	100	2.93±0.04
6	45	25	100	2.82±0.12
7	25	65	100	2.79±0.12
8	45	65	100	2.67±0.04
9	18.2668	45	65	3.06±0.11
10	51.7332	45	65	2.96±0.09
11	35	11.5336	65	2.22±0.07
12	35	78.4664	65	2.80±0.06
13	35	45	6.4338	2.82±0.02
14	35	45	123.566	2.09±0.11
15	35	45	65	2.85±0.01
16	35	45	65	2.81±0.06
17	35	45	65	2.51±0.07

AT: Antocianinas totales.

La capacidad de la ecuación obtenida para describir la variabilidad de respuesta se determinó utilizando el análisis de regresión múltiple y el análisis de varianza como se muestra en la tabla 11. El modelo obtenido es altamente significativo a un valor de probabilidad  $p < 0.5$ . Los coeficientes

de regresión  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_{22}$ ,  $X_{13}$  y  $X_{23}$  resultaron significativos. El valor de  $R_2$  ajustado fue de 0.987, lo cual indica que el modelo es adecuado para predecir los datos experimentales. La falta de ajuste resultó no significativo, lo cual indica que el modelo se ajusta a la influencia de las variables sobre la respuesta con buena predicción. El valor de coeficiente de variación del modelo %CV es muy bajo (CV=1.14%), lo que indica claramente que los valores experimentales están asociados con un alto grado de precisión.

**Tabla 11**

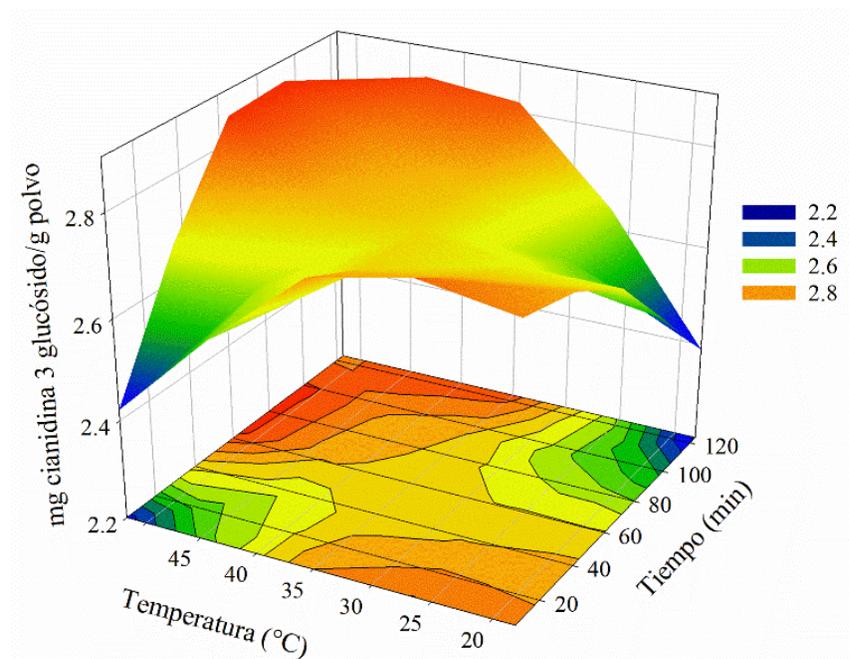
*Coefficientes de regresión estimados del polinomio de segundo orden ajustado para antocianinas totales*

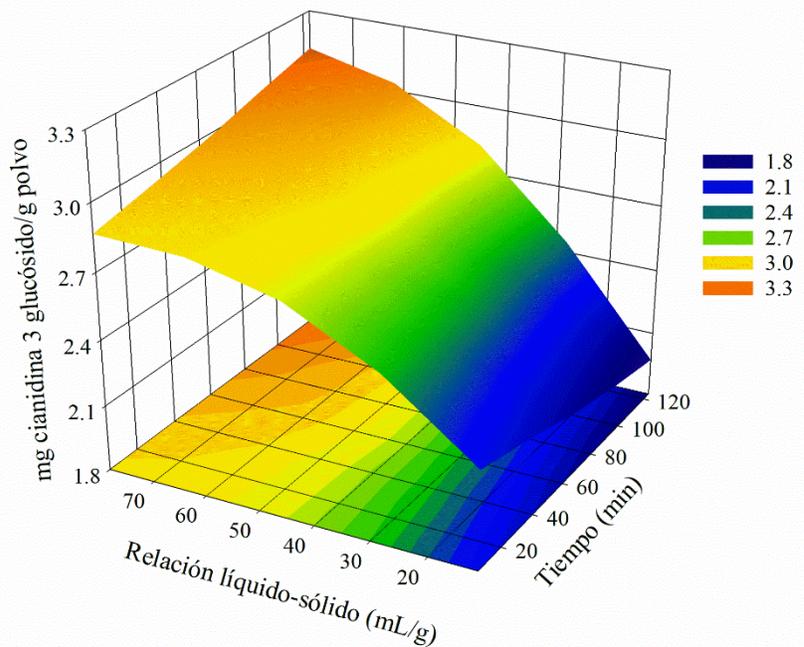
	Coefficientes	Antocianinas monoméricas totales
	Constante	2.81
Lineal	$X_1$	0.032*
	$X_2$	0.27*
	$X_3$	0.0085
Cuadrático	$X_1 * X_1$	-0.021
	$X_2 * X_2$	-0.10*
Interacciones	$X_3 * X_3$	-0.11
	$X_1 * X_2$	0.026
	$X_1 * X_3$	0.082*
	$X_2 * X_3$	-0.059*
	$R^2$ ajustado	.987
	Falta de ajuste	No significativo
	%CV	1.14

\*Términos significativos a 5% ( $p < 0.05$ ). Nota : Estimaciones de parámetros significativos.  $X_1$ : Temperatura;  $X_2$ : relación líquido a sólido;  $X_3$ : tiempo

### 5.3. Efecto de las variables de proceso sobre el contenido de antocianinas totales

La ecuación se utilizó para generar gráficos 3D de la superficie de respuesta para mostrar los efectos de interacción significativo de las variables independientes (Figura 10). De manera general, al incrementar el tiempo y la temperatura de extracción; y la relación líquido a sólido también incrementó el contenido de antocianinas totales y esto se puede observar en las curvíneas de los gráficos. Los términos lineales de temperatura de extracción y relación líquido a sólido fueron significativos y positivos; mientras que el término cuadrático para relación líquido a sólido también fue significativo pero negativo. Los términos de interacción resultaron significativos considerando, el tiempo de extracción con ambos factores temperatura y relación líquido a sólido.





**Figura 10.** Efecto de la variable de extracción sobre el contenido de antocianinas totales (mg/g cáscara liofilizada)

De acuerdo a la literatura, al aumentar la temperatura se produce un incremento en el rendimiento extracción del pigmento, debido a un incremento de la solubilidad de las antocianinas y por ende el coeficiente de difusión del disolvente líquido en la matriz sólida, esto favorece la cinética de desorción de los compuestos de la matriz (Cacace y Mazza, 2003). Sin embargo, las temperaturas elevadas pueden afectar la estabilidad de antocianinas y causar antocianinas monoméricas para polimerizar (Markakis, 1982; Somers, 1966). En este estudio, la temperatura no presenta un carácter significativo en la recuperación de antocianinas, lo cual es una ventaja ya que la extracción podría realizarse a temperatura no altas y por ende, se tendrá una reducción en costo.

Por otro lado, el tiempo demostró ser un factor influyente en la extracción de antocianinas de las cáscaras de caimito, pero con una significancia menor a comparación de la relación líquido-sólido

y esto se debe acorde a la ley de Fick, el cual predice que después de un cierto tiempo, se logra un equilibrio final entre el soluto de la matriz sólida y el solvente de extracción (Silva et al., 2007).

#### 5.4 Optimización y predicción

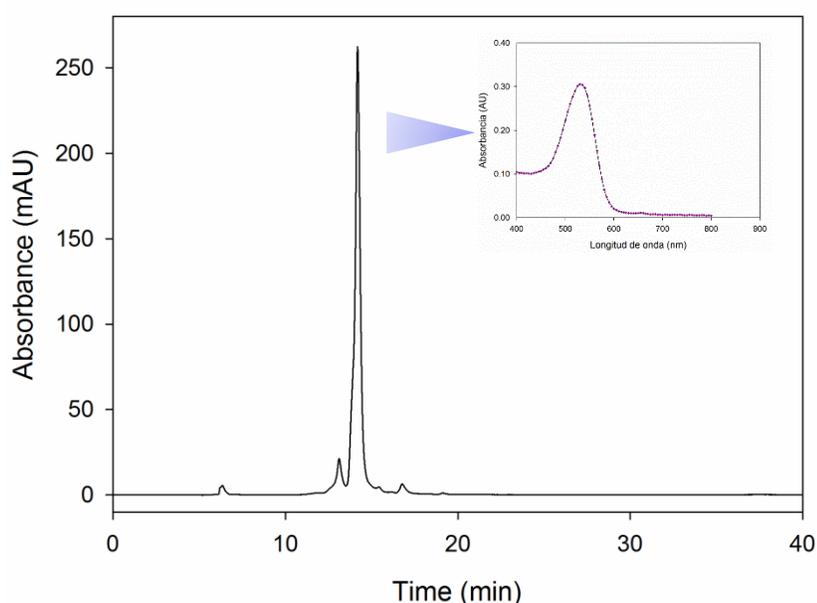
Los valores de las variables independiente obtenidos en la optimización para la recuperación máxima de antocianinas fueron una temperatura de 44.7 °C, una relación líquido-sólido de 64.61 mL/g y un tiempo de 93.58 min (Tabla 12). La extracción se llevó a cabo bajo condiciones optimizados, y posteriormente se realizó la cuantificación de las antocianinas totales mediante el método de pH diferencial y por HPLC, para propósitos de validación del modelo. El valor predicho por el modelo fue 3.1 mg cianidina-3- glucósido/ g polvo seco y el valor experimental por espectrofotometría fue de 3.06 mg cianidina-3- glucósido/ g polvo seco; mientras que por HPLC, el contenido promedio resultó en 3.34 mg/g, mostrando un perfil cromatográfico típico de antocianinas con un tiempo de retención de 14.18 min (Figura 11). A partir de esta información, es muy clara la alta similitud entre los valores predichos y los valores experimentales en la recuperación de antocianinas de la cáscara de caimito morado, por lo que la aplicación de un modelo de regresión de segundo orden mediante la Metodología de Superficies de Respuesta, es una herramienta fiable para la recuperación máxima de antocianinas en el extracto de la cáscara de C.cainito (Figura 12).

**Tabla 12**

*Valores de optimización de los factores para la recuperación máxima de antocianinas*

Variables óptimos			Valor predicho	Valor experimental por espectrofotometría	Valor experimental por HPLC
Temperatura (X <sub>1</sub> , °C)	Relación líquido a sólido (X <sub>2</sub> , mL/g)	Tiempo (X <sub>3</sub> , min)	AT (mg cianidina 3 glucósido/g)	AT (mg cianidina 3 glucósido/g)	AT (mg cianidina 3 glucósido/g)
44.7	64.61	93.58	3.1	3.06± 0.48	3.34± 0.22

La polaridad de las antocianinas es importante para su identificación por HPLC, debido a que influye en su elución en la columna, por ende, en los tiempos de retención. Las antocianinas más polares son las que tienen mayor grupo de hidroxilos en el anillo B por lo cual eluyen antes, mientras que las antocianinas con grupos metoxilos son más apolares y eluyen después, el típico orden de elución de los seis principales antocianos: delfinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina y malvidina. Además, los azúcares en la molécula aumentan la polaridad y acortan los tiempos de retención. Aunque, la polaridad también depende del tipo de azúcar y su posición, en contraste, la acilación de la molécula de los antocianos disminuye la polaridad.



**Figura 11.** Perfil de antocianinas de extracto de *Chrysophyllum cainito* L. por HPLC (A), ampliación del espectro (B).



**Figura 12.** Extracto de antocianinas del polvo de cáscara de caimito morado (*Chrysophyllum cainito* L.)

### **5.5 Cuantificación de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante en EAO**

El aprovechamiento de la cáscara de *Chrysophyllum cainito* L. es nula, en consecuencia, la información científica sobre su composición y actividad antioxidante es escasa. La Tabla 13 muestra el contenido promedio de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y algunos parámetros relacionados al color de antocianinas de los extractos de *C. cainito*. Los resultados de esta investigación fueron comparados con un extracto de antocianinas de zarzamora (*Rubus fruticosus*), la cual se obtuvo bajo las mismas condiciones de extracción utilizado para el caimito. En relación con el contenido de antocianinas, el valor en el caimito morado (4.22 mg cianidina-3-glucósido/100 mL) fue menor en comparación al valor obtenido en la zarzamora (8.45 mg cianidina-3-glucósido/100 mL). Sin embargo, debido a su cultivo y distribución en nuestra región, la zarzamora tiene un costo elevado para el consumidor, por lo que el consumo habitual no es común, y en contraste, el empleo de la cáscara de caimito es una alternativa de aprovechamiento de un producto perteneciente (o presente) a la península de Yucatán.

En la cuantificación de los compuestos fenólicos (Tabla 13), el extracto de la cáscara de caimito presentó un valor de  $18.82 \pm 1.07$  g EAG/100 g polvo seco (PS), cuyo valor es superior a lo reportado para el extracto de zarzamora ( $3.17 \pm 0.15$  g EAG/100 g polvo seco). Así mismo, otro estudio de la cáscara de caimito realizado por Can-Cauich et al. (2017) se obtuvieron valores más bajos de CF de  $1.84 \pm 0.07$  g EAG/100 g PS, esto puede deberse a las diferentes condiciones de extracción y tipo de disolvente de extracción empleada.

Por otro lado, en el ensayo de ABTS el extracto de caimito demostró una mayor actividad antioxidante que en la zarzamora (Tabla 14), esto puede ser atribuido al mayor contenido de compuestos fenólicos y la interacción con las antocianinas presentes; lo cual es interesante debido a que estas propiedades antioxidantes del extracto pueden intervenir en la prevención de enfermedades crónicas-degenerativas del ser humano (Castañeda-Ovando et al., 2009).

En otro resultado, el extracto de *C. cainito* también obtuvo un mayor poder reductor en comparación al extracto de zarzamora; lo cual indica que el extracto de *C. cainito* provoca una mayor reducción del complejo de ferricianuro  $Fe^{3+}$  a la forma ferrosa. Este hecho quizás se pueda explicar porque las antocianinas se caracterizan por poseer un alto poder reductor debido a distintas hidroxilaciones y glucosilaciones que presentan, lo cual les permite actuar como antioxidantes al prevenir o detoxificar procesos que conducen a la producción de radicales libres y a la muerte celular, donde la cianidina 3- glucósido es la que más poder antioxidante presenta (Prior et al., 1998; Kong et al., 2003; Wang et al., 2003).

**Tabla 13**

*Comparación del extracto de antocianinas entre C. cainito y Zarzamora mediante su contenido fenólico, actividad antioxidante y propiedades del color*

Muestra	Antocianinas (mg cianidina 3 glucósido/100 mL)	Compuestos fenólicos ( g de EAG / 100 g PS)	ABTS (mM trolox/100 mL)	Poder reductor (mg eq. Ácido ascórbico/100 mL extracto)	% Color polimerico	IO
<i>Chrysophyllum cainito</i> L.	4.22±0.07 <sup>a</sup> (3.26±0.06 mg/g)	18.82±1.07 <sup>b</sup>	468.93±19.32 <sup>b</sup>	56.25 ± 2.15 <sup>b</sup>	44.15±1.60 <sup>b</sup>	1.65±0.02 <sup>a</sup>
<i>Rubus fruticosus</i>	8.45±0.13 <sup>b</sup>	3.17±0.15 <sup>a</sup>	45.71±0.55 <sup>a</sup>	17.44± 0.31 <sup>a</sup>	27.44±0.36 <sup>a</sup>	2.49±0.02 <sup>b</sup>

Nota: Los valores se expresan como promedio ± estándar (n = 6). IO= índice de obscurecimiento, PS= peso seco.

El porcentaje de color polimérico es un indicador de la presencia de pigmentos copolimerizados y de reacciones de oscurecimiento, para su determinación se agrega la solución de metabisulfito a las muestras con el propósito para revelar la presencia de materiales poliméricos. En la Tabla 13, de los dos extractos, el valor del % color polimérico resultó mayor para cáscara de *C. cainito*, esto puede atribuirse a la presencia de complejos taninos-antocianinas y los compuestos pardos en el extracto de cáscara de caimito, de acuerdo a la literatura las antocianinas polimerizadas pueden ser resistentes al blanqueado de metabisulfito, dado que no sufren un cambio reversible de color con el cambio de pH y no se pueden combinar con el bisulfito para formar un producto de ácido sulfónico incoloro, debido a que el carbono de la posición 4 de la molécula de antocianina no está disponible, por encontrarse unido covalentemente a otro compuesto fenólico (Wrolstad et al., 2005; Peng et al., 2010; Paulino, 2017) por lo que se puede atribuir una mayor presencia de éstos compuestos en el extracto de caimito.

Por su parte el índice de oscurecimiento (IO), es un parámetro de calidad en la pigmentación de jugos con presencia de antocianinas y está inversamente relacionado con el porcentaje de color polimérico (% CP), con valores más bajos de IO es mayor el valor de % CP (Dorris et al., 2018), tal como fue observado en este estudio En la Tabla 13 se observa IO del caimito ( $1.65 \pm 0.02$ ) es menor que en la zarzamora ( $2.49 \pm 0.02$ ), esto podría ser atribuido a presencia de proantocianinas en el extracto de caimito (Dorris et al., 2018).

## 5.6 Identificación de antocianinas por HPLC-MS-QTOF

Para la separación e identificación de las antocianinas del extracto de *C. cainito* fue utilizado un sistema HPLC-MS-QTOF (Tabla 14), donde el acoplamiento de una técnica analítica de separación como la cromatografía de líquidos (sistema de introducción especial de la muestra) con la espectrometría de masas (MS); las muestras son ionizadas, separadas por su relación masa/carga ( $m/z$ ), detectados y registrados, proporcionando una técnica con alta especificidad, sensibilidad, brindando información cualitativa y cuantitativa para identificación de diversidad de compuestos como las antocianinas (Gómez y González, 2010; Alberts et al., 2012).

En el presente trabajo se identificaron siete antocianinas (Tabla 14) en la cáscara de *Chrysophyllum cainito* L., debido a la carga natural positiva de las antocianinas y la ionización por electrospray y la fragmentación de masas (ESI-MS/MS), se seleccionó el modo de iones positivo para el análisis.

La identificación de las antocianinas se realizó en base a sus propiedades (tiempos de retención, el fragmento generado, fórmula) que fueron verificados con patrones internos y con lo reportado en la literatura.

**Tabla 14**

*Antocianinas identificadas en la cáscara de C. cainito por HPLC-MS-QTOF*

<b>t<sub>R</sub>*</b> <b>(min)</b>	<b>Fórmula molecular</b>	<b>M<sup>+</sup></b>	<b>Fragmentos indicativos MS- MS</b>	<b>Nombre</b>
7.40	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	465.1036	303.05	Delfinidina -3-glucósido
8.97	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>	449.1101	287.05	Cianidina-3-galactósido
9.25	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>1</sub>	449.1101	287.05	Cianidina -3-glucósido
10.30	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	433.1145	271.05	Pelargonidina -3- galactósido
11.20	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	433.1145	271.05	Pelargonidina -3- glucósido
12.6	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	419.0987	287.05	Cianidina -3-arabinósido
14.67	C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> O <sub>14</sub>	535.1093	287.05	Cianidina- 3 –malonil glucósido

\* t<sub>R</sub>: tiempo de retención

La Delfinidina-3-glucósido fue identificada a un tiempo de retención (t<sub>R</sub>) de 7.40 min, con un ión molecular (M<sup>+</sup>) con m/z de 465.10 y con un fragmento 303.5 resultante de una pérdida de 162 que corresponde a una hexosa (glucosa).

En dos picos a tiempos de retención (t<sub>R</sub>) de 8.97 y 9.25 min, presentaron un ión M<sup>+</sup> con m/z de 449.11 y con un fragmento m/z de 287.05 correspondiente a una aglicona de cianidina, fueron identificadas como Cianidina-3- galactósido y Cianidina-3- glucósido, respectivamente. Los picos

correspondientes a 10.30 min y 11.20 min, presentaron (M+) m/z de 433 con fragmento de 271 que se obtiene después de una pérdida de 162 uma que corresponde a una hexosa, fueron identificados como pelargonidina-3-galactósido y pelargonidina-3-glucósido respectivamente, esto por el orden de elución verificado con patrones internos.

La Cianidina-3-malonil glucósido fue identificada a un tiempo de retención ( $t_R$ ) de 14.67 min con un ión (M+) con m/z de 535.10, y un fragmento con m/z de 287.05 equivalente a una pérdida de 248 uma (-162 uma a una hexosa, -86 al malonil) (Kajdžanoska et al., 2010)

En la Tabla 15 se muestran los compuestos fenólicos tentivamente identificados y clasificados en ácidos fenólicos, flavanoles, flavonoles. Para su confirmación se tomó en cuenta el tiempo de retención ( $t_R$ ), el ión molecular, fueron comparados con estándares y con lo reportado en la literatura.

**Tabla 15**

*Compuestos fenólicos identificados en la cáscara de C. cainito por HPLC-MS-QTOF*

$t_R^*$ (min)	Formula molecular	M-	Fragmentos MS-MS	Nombre
<b>Ácidos fenólicos</b>				
5.375	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	169.0167		Ácido gálico
9.186	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	153.0208		protocatechuico
27.69	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	121.0299		Ácido benzoico
$t_R$		M+		Nombre:
<b>Flavanoles</b>				
7.46	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	307.082	139.03/289.05	Galocatequina
10.31	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	307.0814	139.03/195.06	Epigalocatequina
12.58	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	291.0869	139.03/123.04	Catequina
15.876	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	291.0871	139.03/123.04	Epicatequina
16.617	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	459.0929	139.03	Epigalocatequina galato
23.29	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	443.098	291.08	Epicatequina-3-galato
<b>Flavonoles</b>				
19.23	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	481.0974	319.04	Miricetina 3-o- galactósido
19.67	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub>	481.0988	319.04	Miricetina 3-o- glucósido
20.74	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	451.0883	319.04	Miricetina 3-o- pentosa (arabinosa)
21.96	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	451.0876	319.04	Miricetina 3-o-pentosa (ribosa)

22.457	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	451.0883	319.04	Miricetina 3-o-pentosa (xilosa)
22.663	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	465.1039	319.04	Miricetina 3-o-ramnósido
23.19	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	465.1038	303.5	Quercetina-3-o-galactósido
23.51	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	465.1039	303.5	Quercetina-3-o-glucósido
25.12	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	435.0934	303.5	Quercetina-3-o-pentosa (arabinosa)
25.8	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	435.0923	303.5	Quercetina-3-o-pentosa (ribosa)
26.56	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	435.0928	303.5	Quercetina-3-o-pentosa (xilosa)
27.24	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	449.1084	303.5	Quercetina-3-o ramnósido

\* **t<sub>R</sub>**: tiempo de retención

Se identificaron tres ácidos fenólicos primeramente el ácido gálico ( $t_R=5.37$ , ión molecular con  $m/z$  de 169.01 en ( $M^-$ ), luego el protocatechuico ( $t_R=9.186$ , ión molecular con  $m/z$  de 153.02 en ( $M^-$ ) y por último el ácido benzoico ( $t_R=27.69$ , ión molecular con  $m/z$  de 121.02 en ( $M^-$ ), el análisis se llevó en modo negativo de ionización por electroaspersión (ESI) por tener mayor sensibilidad que el modo positivo para estos compuestos, estos mismos ácidos fenólicos han sido identificados en la semilla del fruto caimito por Fujuki et al.(2010).

Respecto a las flavanoles fueron analizados en modo positivo. Donde la catequina, epicatequina y sus derivados fueron identificados.

Epicatequina y catequina son los compuestos mayoritarios en frutas. Las catequinas comúnmente se pueden encontrar en vino y chocolate, en contraste, la galocatequina, epigalocatequina y epigalocatequina galato aparecen principalmente en el té (Quiñones et al., 2012).

La catequina fue identificada en la cáscara a un  $t_R=12.58$  min, por su parte, la epicatequina fue localizada a un  $t_R=15.87$ , ambas presentaron un ión molecular con  $m/z$  291.08, para poder diferenciar una de la otra se empleó estándares.

La galocatequina fue identificada a un  $t_R=7.46$  min con un ión molecular  $m/z$  de 307.08 reportado en el fruto por Luo et al. (2002). La epigalocatequina se identificó  $t_R=10.31$  min con un ión molecular  $m/z$  307.08. La epigalocatequina galato a  $t_R=16.61$  con un ión molecular con  $m/z$  de 459.09. Por último, a un  $t_R=23.29$  min, con un ión molecular de  $m/z$  443.09 fue identificado epicatequina-3-galato.

El análisis de los flavonoles se llevó en modo positivo de ESI tanto como su UV-vis característico de 270 a 290 nm, se pudo identificar derivados de quercetina y miricetina.

La miricetina-3-o-galactósido y la miricetina-3-o-glucósido, fueron identificados a un tiempo retención de 19.23 y 19.67 min, respectivamente, en ambos se identificó un ion molecular de m/z de 481.09 y un fragmento de m/z de 319.04, característico de la miricetina con una pérdida de 162 uma correspondiente a una hexosa.

Así mismo, se identificaron miricetinas glucosidadas con pentosas: miricetina-3-o-arabinosa ( $t_R=20.74$  min), miricetina-3-o-ribosa ( $t_R=21.96$  min), miricetina-3-o-xilosa ( $t_R=21.96$  min), que presentaron un ión molecular en relación m/z de 451.08, con un fragmento de m/z 319.04, como respuesta a una pérdida de 132 correspondiente a una pentosa. Por último, a un tiempo de retención de 22.66 min se encontró un ión molecular con m/z de 465.10 y un fragmento de 319.04, en respuesta de la pérdida de 146 uma correspondiente a un resto de ramnosa.

La quercetina es el flavonol más abundante se puede encontrar en forma aglicona, glucosidada o en ambas, entre las cuales la glucosidada posee una mayor absorción del total ingerido (52%) comparada con su forma aglicona (20%), donde el azúcar unido brinda más hidrofiliidad, mayor peso molecular el cual requiere un transporte activo como el transportador de glucosa sodio dependiente (SGTL-1) localizado en el intestino delgado, por su parte en su forma aglicona la cual se puede transportar a través de las membranas por difusión pasiva en el intestino grueso (Hertog et al., 1996; Hollman et al., 1995, Aherne et al., 2002; Vicente-Vicente et al., 2013). En la cáscara de caimito, seis picos fueron identificados como quercetinas glucosidadas, en dos picos en el tiempo de 23.19 y 23.51 min se observó una m/z de 465 con un fragmento m/z de 303.95, generado por la pérdida de una hexosa (-162 uma) al orden de elución se identificaron como quercetina-3-o-galactósido y quercetina-3-o-glucósido. Por consiguiente, tres picos presentaron una m/z de 435.09 y un fragmento m/z de 303.5 correspondiente a la quercetina con pérdida de una pentosa (-132 uma), tomando en cuenta la secuencia de los azúcares se identificaron tentativamente como quercetina-3-O-arabinosa ( $t_R=25.12$  min), quercetina-3-O-ribosa ( $t_R=25.8$ ) y quercetina-3-o-xilosa ( $t_R=26.56$ ). Por último, fue identificada la quercetina-3-O-ramnósido a un tiempo de 27.24 min, con una m/z de 449.10 y un fragmento de 303.5, en respuesta de la pérdida de 146 uma correspondiente a un resto de ramnosa (Montoya y Jimenez, 2011).

El caimito es perteneciente a la familia de la Sapotaceae, entre los compuestos fenólicos encontrados en diferentes especies de esta familia que coinciden con los identificados en este

trabajo están la catequina (*Manilkara zapota*, *Pouteria sapota*, *Argania spinosa*, *Vitellaria paradoxa*), galocatequina (*Manilkara zapota*), epicatequina (*Manilkara zapota*, *Argania spinosa*, *Pouteria sapota*, *Vitellaria paradoxa* y *Tridesnistemon omphalalocarpoides*), miricetina (*Argania Spinosa*), quercetina (*Argania Spinosa*, *Vitellaria paradoxa* y *Mimusops Manilkara*), ácido gálico (*Argania Spinosa*, *Manilkara zapota*, *Pouteria abovata*, *Pouteria sapota*) (Baky et al., 2016)

### **5.7 Estudio de estabilidad de extracto de antocianinas de la cáscara *Chrysophyllum cainito* L. a diferentes pH almacenados a 4 °C y 25°C**

La estabilidad juega un papel fundamental en la evaluación de compuestos naturales con potencial como colorantes (Mojica et al., 2017). La investigación de la cinética de la reacción de degradación de antocianinas se puede utilizar para predecir la degradación de compuestos durante el tratamiento térmico y el período de almacenamiento a partir del orden de reacción y la constante de velocidad. Los efectos principales y la interacción pH-temperatura afectaron significativamente el valor de la constante de velocidad y el tiempo de vida media de las antocianinas de *C. cainito* (Tabla 16). La cinética de degradación durante el almacenamiento fue característico de un modelo de reacción de primer orden con un valor del coeficiente de determinación,  $R^2 > 0.97$ .

La Tabla 16 muestra la constante de velocidad de degradación, el tiempo de vida media de la antocianina de *C. cainito* y el color obtenido al final del almacenamiento.

A medida que la temperatura tuvo un incremento de 4 a 25°C para cada pH, también se observó un aumento en la constante de la degradación del pigmento y una disminución correspondiente en los valores  $t_{1/2}$ . La estabilidad de las antocianinas contenido en los extractos o jugos depende de la temperatura (Hellström, Mattila y Karjalainen, 2013).

Las antocianinas de *C. cainito* fueron más estables a bajas temperaturas (4°C) y pH=4.3, con una de vida media ( $t_{1/2}$ ) de  $40.83 \pm 3.89$  días, tiempo necesario para el 50% de la degradación del pigmento en el extracto. Sin embargo, se encontró que el extracto es menos estable a un pH 2.5 a 25 °C con una vida media baja de  $1.19 \pm 0.15$  días.

Ante lo anterior, el pH de 4.3 tuvo un efecto positivo o protector en la estabilidad del extracto de caimito; un comportamiento similar es reportado por Ozela et al. (2007) en el extracto de los frutos de vid de espinaca blanca, donde los pigmentos eran más estables a pH altos de pH 5.0 y 6.0 que a pH 4.0, esto podría deberse a la presencia de antocianinas aciladas en el extracto que son más resistentes a la decoloración con el aumento del pH que sus análogos no acilados (Mazza y

Brouillard, 1987; Amicé et al., 1990; Baranac y Amicé, 1990; Dao et al., 1998; Mirabel et al., 1998; Cabrita et al., 2000; Melo et al., 2000; Musoke, 2002). Se puede confirmar que la estabilidad de las antocianinas de *C. cainito* depende de la temperatura y el pH asociado con la estructura química y la copigmentación.

**Tabla 16**

Constante de velocidad de degradación, tiempo de vida media de antocianinas de *Chrysophyllum cainito* L. a diferentes pHs después de su almacenamiento a 4 y 25 °C

pH °C	2.5		3		4.3		Valor F-ratio		
	4	25	4	25	4	25	pH	Temperatura	Interacción
$k$ (días)	0.08±0.01a	0.58±0.07b	0.07±0.00a	0.50±0.016b	0.01± 0.00a	0.15±0.00b	65.27*	333.58*	32.72*
$t_2^1$ (días)	7.79± 1.03b	1.19±0.15a	8.73±1.01b	1.38±0.04a	40.83±3.89b	4.5±0.25a	148.01*	290.97*	99.04*
$R^2$	0.98±0.01	0.99±0.00	0.98±0.00	0.99±0.00	0.99±0.00	0.98±0.02	-	-	-
Color alcanzado al final de almacenamiento							-	-	-

\*Son significativos a  $p < 0.05$ . Los valores se expresan como promedio  $\pm$  estándar (n = 6)

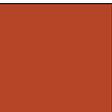
### 5.8 Estudio de estabilidad de extracto de antocianinas de la cáscara *Chrysophyllum cainito* L. ante luz

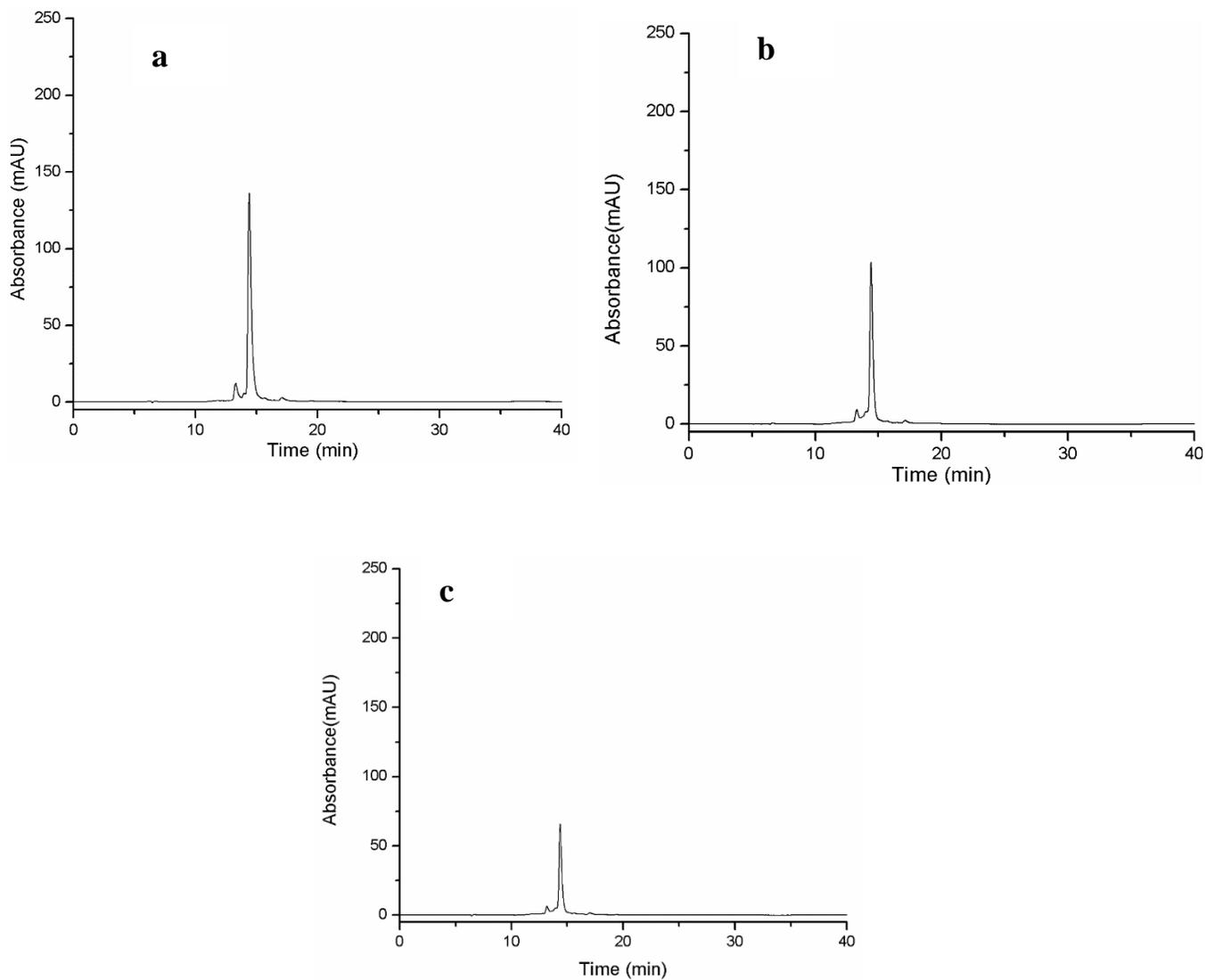
La luz es un aspecto muy importante para establecer las condiciones de almacenamiento de un producto. La tabla 17 muestra el efecto de la luz en función del tiempo sobre la estabilidad de las antocianinas del extracto de *C. cainito* a pH= 4.3 y el color obtenido al final del almacenamiento.

El extracto muestra poca estabilidad ante la luz, debido a que el tiempo de vida media es de sólo  $0.93 \pm 0.00$  días expuesto a luz y  $2.24 \pm 0.07$  días en ausencia de luz. Esto se podría deber a que la luz puede acelerar cambios fotoquímicos ocasionando la degradación de las antocianinas hasta su forma de chalcona (Eiro y Heinonen, 2002). Estos resultados mostraron que la exposición a la luz provocó un aumento en la reacción de fotodegradación de las antocianinas presentes en el extracto de *C. cainito*. Esta información sugiere la importancia del uso de envases oscuros para mantener el color de las antocianinas cuando se utilizan como colorantes naturales. El número de unidades de acilo intramoleculares contribuye a la estabilidad a luz y calor a pH más bajo, mientras que las características de las unidades de acilo intramoleculares influyen en la estabilidad a pH más alto (Matsufuji, 2007).

**Tabla 17**

*Constante de degradación, vida media de antocianinas de Chrysophyllum cainito L. ajustado a pH de 4.3, almacenamiento en presencia y ausencia de luz almacenados a 25 °C*

	pH 4.3	
	Luz	Sin luz
$k(\text{días})$	$0.73 \pm 0.00b$	$0.30 \pm 0.01a$
$t_2^1$	$0.93 \pm 0.00a$	$2.24 \pm 0.07b$
$R^2$	$0.99 \pm 0.00a$	$0.99 \pm 0.00a$
Color alcanzado al final de almacenamiento		



**Figura 13.** Perfil cromatográfico de antocianinas del extracto de *C. cainito* ajustado a pH 4.3 y almacenado en presencia o ausencia de luz a 25°C. Donde a= tiempo 0 h , b= sin presencia de luz a 26.13 h; c= expuesto a luz (20W) a 27 h.

## 6. CONCLUSIONES

La metodología de superficie de respuesta fue útil para la optimización del proceso de extracción de antocianinas de la cáscara liofilizada de *C. cainito* L. El efecto de las variables independientes sobre el contenido de antocianinas resultó altamente significativo. La similitud entre los valores predichos y experimentales en condiciones óptimas indica la idoneidad del modelo generado para predecir la respuesta. Se encontró que las condiciones óptimas de extracción de antocianinas fueron un tiempo de extracción de 93.58 min, una proporción de disolvente a muestra de 64.61 mL/g y una temperatura de 44.7 °C. El análisis por HPLC indicó que el extracto obtenido en condiciones óptimas fue rico en cianidina-3-glucósido. Por HPLC-MS-QTOF se identificó la presencia de siete antocianinas, tres ácidos fenólicos, seis flavanoles y 12 flavonoles, lo cual sustenta que tengan alta actividad antioxidante; considerando a las cáscaras liofilizadas de *C. cainito* como fuente de antioxidantes naturales. El extracto de antocianinas resultó más estable a baja temperatura a un pH=4.3 y se sugiere envasar en contenedores oscuros por su poca estabilidad a la luz.

## 7. REFERENCIAS

- Aguilera-Ortíz, M., del Carmen Reza-Vargas, M., Chew-Madinaveita, R. G., y Meza-Velázquez, J. A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnia*, 13(2), 16-22.
- Aguilera-Ortíz, M., del Carmen Reza-Vargas, M., Madinaveitia, R. G. C., Valenzuela, J. A., y Baca, P. R. (2012). Antocianinas de higo como colorantes para yogur natural. *Biotecnia*, 14(1), 18-24
- Aherne, S., O'Brien, M. (2002). Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism, *Nutrition*, 18,75–81.
- Alberts, P., Stander, M., de Villiers A. (2012). Advanced ultra high pressureliquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for the screening of red wine anthocyanins and derived pigments. *Journal of Chromatography A*, 1235, 92-102
- Álvarez-Vargas, J., Alia-Tejacal, I., López-Martínez, V., Acosta-Durán, C. M., Andrade-Rodríguez, M., Colinas-León, M. T., y Villegas-Torres, O. (2006). Caracterización de frutos de caimito (*Chrysophyllum cainito* L.), en el estado de Morelos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(2).
- Amić, D., Baranac J., y Vukadinović, V. (1990). Reactivity of some flavylum cations and corresponding anhydrobases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 936–940.
- Amr, A., y Al-Tamimi, E. (2007). Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 985–991
- AOAC Official Methods of Analysis, AOAC Official Method 967.21, Chapter 45, p.16, 1995
- Awika, J. M., Rooney, L. W., y Waniska, R. D. (2005). Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 90(1–2), 293–301.
- Badui, S. (2013). *Química de los Alimentos*. (5<sup>ta</sup>) México: Editorial Pearson
- Baky, M. H., Kamal, A. M., Elgindi, M. R., y Haggag, E. G. (2016). A review on phenolic compounds from family Sapotaceae. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(2), 280.
- Baranac J., Amić D. (1990). Structural transformations of apigenidin-type flavylum salts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 2111–2115

- Barbosa-Cánovas, G. V., Fontana, A. J., Schmidt, S. J., y Labuza, T. P. (2007). *Water activity in foods. Fundamentals and applications*. Ames, IA:Wiley-Blackwell.
- Baublis, A., Spomer, A., Beber-Jimenez, M. (1994). Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *Journal of food science*, 59 (6), 1219-1222.
- Bischoff, H. (1994). Pharmacology of R-Glucosidase Inhibition. *Eur. J. Clin. Invest.*, 24, 3 -10
- Bridgers, E. N., Chinn, M. S., y Truong, V. D. (2010). Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 613-620.
- Brouillard, R. (1988). Flavonoids and flower colour. *In The flavonoids Springer*. 525-538.
- Cabrita, L., Fossen, T., y Andersen, Ø. M. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food chemistry*, 68(1), 101-107.
- Cacace, J. E., y Mazza, G. (2002). Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5939–5946.
- Cacace, J. E., y Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379–389.
- Calabria, J. (1968). *Frutales de Venezuela. Características e Indicaciones Prácticas para su Cultivo*. (2<sup>a</sup>). Caracas.
- Campbell C. (1974) “Research in CAIMITO *Chrysophyllum cainito*)” in *Florida Proc. Tropical Region Amer. Soc. Hort.* 18, 123-127.
- Can-Cauich, C. A., Sauri-Duch, E., Betancur-Ancona, D., Chel-Guerrero, L., González-Aguilar, G. A., Cuevas-Glory, L. F., y Moo-Huchin, V. M. (2017). Tropical fruit peel powders as functional ingredients: Evaluation of their bioactive compounds and antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 37, 501-506.
- Carbita L., Fossen T., Andersen O., (2000). Colour and stability of six common anthocyanin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 68, 101–107.
- Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., y Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food chemistry*, 113(4), 859-871.
- Chaudhary, B., y Mukhopadhyay, K. (2013). Solvent optimization for anthocyanin extraction from *Syzygium cumini* L. Skeels using response surface methodology. *International journal of food sciences and nutrition*, 64(3), 363-371

- Chel-Guerrero, L. D., Sauri-Duch, E., Fragoso-Serrano, M. C., Pérez-Flores, L. J., Gómez-Olivares, J. L., Salinas-Arreortua, N., ... y Mendoza-Espinoza, J. A. (2018). Phytochemical profile, toxicity, and pharmacological potential of peels from four species of tropical fruits. *Journal of medicinal food*, 21(7), 734-743.
- Chinachoti, P. (1993). "Water mobility and its relation to food functionality of sucrose-containing food systems". *Food Technol.* 45(1):134-140.
- Cisowska, A., Wojnicz, D., y Hendrich, A. B. (2011). Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Natural product communications*, 6(1), 1934578X1100600136.
- Cisowska, A., Wojnicz, D., y Hendrich A. (2011) Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Nat Prod Commun*, 6(1), 149–156.
- Collison, A., Yang, L., Dykes, L., Murray, S., y Awika, J. M. (2015). Influence of genetic background on anthocyanin and copigment composition and behavior during thermoalkaline processing of maize. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(22), 5528-5538.
- Consejo Internacional de la Alimentación de la Información y Administración de la Fundación de Alimentos y Drogas de 2004
- da Rosa, R. L., de Almeida, C. L., Somensi, L. B., Boeing, T., Mariano, L. N. B., Krueger, C. D. M. A., ... y de Andrade, S. F. (2019). *Chrysophyllum cainito* (apple-star): a fruit with gastroprotective activity in experimental ulcer models. *Inflammopharmacology*, 27(5), 985-996.
- Dao L., Takeoka G., Edwards R., Berrios J., De J. (1998) Improved method for stabilization of anthocyanidins. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 46, 3564–3569.
- Das, A. B., Goud, V. V., y Das, C. (2017). Extraction of phenolic compounds and anthocyanin from black and purple rice bran (*Oryza sativa* L.) using ultrasound: A comparative analysis and phytochemical profiling. *Industrial crops and products*, 95, 332-341.
- de Souza, V., Pereira, P., Queiroz, F., Borges, S., y Carneiro, J. (2012). Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. *Food chemistry*, 134(1), 381-386.
- Delascio, F., (1985). *Algunas plantas usadas en la medicina empírica venezolana*. Direcciones de Investigaciones Biológicas, División de vegetación, Jardín Botánico-Inparques: Caracas.

- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., y Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40(3), 173-289.
- Delgado-Vargas, F., y Paredes-López, O. (2003). Anthocyanins and betalains. *Natural colorants for food and nutraceutical uses*. (167–211).
- Dini, C., Zaro, M. J., y Viña, S. Z. (2019). Bioactivity and functionality of anthocyanins: a review. *Current Bioactive Compounds*, 15(5), 507-523.
- Doan, H. V., y Le, T. P. (2020). Chrysophyllum cainito: A Tropical Fruit with Multiple Health Benefits. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020.
- Domene, M., y Segura, M. (2014). Parámetros de calidad interna de hortalizas y frutas en la industria agroalimentaria. *Negocios Agroalimentario Cooper Cajamar Fichas Transf*, 5, 1-18.
- Donner, H., Gao, L., y Mazza, G. (1997). Separation and characterization of simple and malonylated anthocyanins in red onions, *Allium cepa* L. *Food Research International*, 30(8), 637–643.
- Dorris, M. R., Voss, D. M., Bollom, M. A., Krawiec-Thayer, M. P., y Bolling, B. (2018). Browning Index of Anthocyanin-Rich Fruit Juice Depends on pH and Anthocyanin Loss More Than the Gain of Soluble Polymeric Pigments. *Journal of food science*, 83(4), 911-921.
- Draper, N. R. y Lin, D. K. J. (1990). Small Response-Surface Designs. *Technometrics*, 32,187-194.
- Dyrby, M., Westergaard, N., y Stapelfeldt, H. (2001). Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food chemistry*, 72(4), 431-437.
- Eiro, M., y Heinonen, M. (2002). Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect on intermolecular copigmentation *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7461–7466.
- Ella Missang, C., Guyot, S., y Renard, C., (2003). Flavonols and anthocyanins of bush butter, *Dacryodes edulis* (G. Don) H.J. Lam, Fruit. Changes in their composition during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,51(25), 7475–7480.
- Fennema, O. (2000). *Química de los alimentos*. (2ª). España: Acribia.
- Ferreira Ozela, E., Stringheta, P. C., y Cano Chauca, M. (2007). Stability of anthocyanin in spinach vine (*Basella rubra*) fruits. *Ciencia e investigación agraria*, 34(2), 115-120
- Figueiredo, J. L., Pereira, M. F. R., Freitas, M. M. A., y Orfao, J. J. M. (1999). Modification of the surface chemistry of activated carbons. *carbon*, 37(9), 1379-1389.

- Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., y Kulling, S. E. (2006). Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European Journal of Nutrition*, 45(1), 7–18.
- Fossen, T., y Andersen, O., M. (2003). Anthocyanins from red onion, *Allium cepa*, with novel aglycone. *Phytochemistry*, 62(8), 1217–1220.
- Francis, F. J. (1999). Anthocyanins and betalains. *Colorants*, 55-66
- Fujuki, T., Tonin, F., Tavares, M. (2010). Optimization of a method for determination of phenolic acids in exotic fruits by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 430-438.
- Gallo P., F. (1996). *Manual de fisiología, patología postcosecha y control de calidad de frutas y hortalizas*. SENA, Regional Quindío, Armenia, Colombia.
- Galván-Araujo, S. P., Mendoza-Corvis, F. A., y Hernández, E. J. (2016). Estabilidad de antocianinas en la pulpa del caimito (*Chrysophyllum cainito* L.). *Agronomía Colombiana*, 34(1), S1356-S1358
- Garibay, M., Ramírez, R., y Canales, A. (Eds.). (1993). *Biotecnología alimentaria*. México: Editorial Limusa.
- Garzón, G., (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3).
- Ge, Q., y Ma, X. (2013). Composition and antioxidant activity of anthocyanins isolated from Yunnan edible rose (Anning). *Food Science and Human Wellness*, 2(2), 68-74
- George F., Figueiredo P., Toki K., Tatsuzawa F., Saito N., Brouillard R., Influence of trans-cis isomerisation of coumaric acid substituents on colour variance and stabilisation in anthocyanins. *Phytochem.*, 2001, 57, 791–795.
- Giusti, M. M., y Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, (1), F1-2.
- Gómez, M., y González, B. (2010). *Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores*. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.
- Granato, D., y Masson, M. (2010). Instrumental color and sensory acceptance of soy-based emulsions: a response surface approach. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 30(4), 1090–1096.
- Guarnizo Franco, A., y Martínez Yepes, P. (2009). *Experimentos de química orgánica con enfoque en ciencias de la vida*. Armenia: Ed. Elizcom, 220.

- Gutiérrez Pulido, H., y De la Vara Salazar, R. (2008). Análisis y diseño de experimentos. Análisis y diseño de experimentos.
- Harbourne, N., Jacquier, J. C., Morgan, D. J., y Lyng, J. G. (2008). Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods. *Food Chemistry*, 111(1), 204-208
- Hellstrom, J., Mattila, P., y Karjalainen, R. (2013). Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(1), 12-19.
- Heras, I., Alvis, A., y Arrazola, G. (2013). Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (*Solana melonera* L.). *Información tecnológica*, 24(5), 93-102.
- Hertog, M. L., y Hollman, P. H. (1996). Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *European Journal of Clinical Nutrition*, 50(2), 63-71.
- Hollman, P., de Vries, J., van Leeuwen, S., Mengelers, M., y Katan, M. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American journal of clinical nutrition*, 62:1276-1282.
- Humberto, G. P., y De La Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. México: Mc Graw Hill.
- Hurtado, N. H., y Pérez, M. (2014). Identificación, estabilidad y actividad antioxidante de las antocianinas aisladas de la cáscara del fruto de capulí (*Prunus serotina* spp capuli (Cav) Mc. Vaug Cav). *Información tecnológica*, 25(4), 131-140.
- Jiménez-González, O. (2017). Obtención, evaluación de pigmentos microencapsulados a partir de frutos xkijit (*Renealmia alpinia*) e incorporación en una matriz alimenticia ( Tesis de maestría ), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Jiménez-López, C. (2017). *Desarrollo de un aditivo colorante natural a base de cianidina obtenido a partir de frutos de Arbutus unedo L.: optimización de la extracción y estudio de su aplicación en gofres* (Disertación doctoral). Instituto Politécnico de Bragança y a la Universidad de Salamanca, Bragança.
- Jurd, L., Stevens, K., y Manners, G. (1972). Isoflavones of the heartwood of *Dalbergia retusa*. *Phytochemistry*, 11(8), 2535-2540.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., y Heinonen, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(8), 4076-4082.

- Kajdžanoska, M., Gjamovski, V., y Stefova, M. (2010). HPLC-DAD-ESI-MSn identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 29(2), 181-194.
- Kapasakalidis, P. G., Rastall, R. A., y Gordon, M. H. (2006). Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4016–4021.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., y Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food y nutrition research*, 61(1), 1361779.
- Khuri, A.I., Cornell, J.A., 1996. Response Surfaces Designs and Analyses. Marcel Dekker, New York
- Konczak, I., y Zhang, W. (2004). Anthocyanins more than nature's colours. *BioMed Research International*, 5, 239-240.
- Kong, J., Chia, L., Goh, N., Chia, T., y Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64, 923–933.
- Kopjar, M., Pilizota, V., Tiban, N. N., Subaric, D., Babic, J., Ackar, D., y Sajdl, M. (2009). Strawberry jams: influence of different pectins on colour and textural properties. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(1), 20-28.
- Koyama, T., Watanabe, H., e Ito, H. (2016). The association of circulating inflammatory and oxidative stress biomarker levels with diagonal earlobe crease in patients with atherosclerotic diseases. *Journal of cardiology*, 67(4), 347-351.
- Kuehl, R. O. (2001). *Diseño de experimentos: Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación*.
- Kumoro, A. C., Alhanif, M., y Wardhani, D. H. (2020). A critical review on tropical fruits seeds as prospective sources of nutritional and bioactive compounds for functional foods development: A case of Indonesian exotic fruits. *International journal of food science*, 2020.
- Lema, P., Pérez, M. A., Martínez, M. T., y Navarro, H. (2017). Importancia y caracterización de frutales criollos en dos comunidades de Tuxpan, Veracruz. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 11(2), 306-313.
- Lewis, C., y Walker, J. (1995). Efecto de los polisacáridos sobre el color de las antocianinas. *Química de los alimentos*, 319-325.

- López-Martínez, L. X., Aguilar Cisneros, L. M., y Dublán-García, O. (2014). Actividad antioxidante e inhibidora de  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa de tres variedades de cebolla (*Allium cepa* L.). *Nova scientia*, 6(12), 234-347.
- Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., y Alves, V. D. (2019). Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*, 24(22), 4132.
- Luo, X. D., Basile, M. J., y Kennelly, E. J. (2002). Polyphenolic antioxidants from the fruits of *Chrysophyllum cainito* L. (star apple). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1379-1382
- Markakis, P. (Eds.). (1982). *Anthocyanins as Food Colors*. New York: Academic Press.
- Martínez, Z., Rojas, S., Borda, G., Hastamorir, C., y Medina, R. (2011). Stability of anthocyanins in juice and concentrate of agraz (*Vaccinium meridionale* Sw.). *Revista-Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 64(1), 6015-6022.
- Matsufuji, H., Kido, H., Misawa, H., Yaguchi, J., Otsuki, T., Chino, M., Takeda, M., y Yamagata, K. (2007). Stability to light, heat, and hydrogen peroxide at different pH values and DPPH radical scavenging activity of acylated anthocyanins from red radish extract. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(9), 3692-3701.
- Mazza G., y Brouillard R. (19.87) Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry*, 25, 207–225.
- Mazza, G., y Miniati, E. (1993). *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc.
- McGuire, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27(12), 1254-1255.
- Melo M.J., Moncada M.C., Pina F., On the red colour of raspberry (*Rubus Idaeus*). *Tetrahedron Lett.*, 2000, 41, 1987–1991.
- Mena, P., Domínguez-Perles, R., Gironés-Vilaplana, A., Baenas, N., García-Viguera, C., y Villano, D. (2014). Flavan-3-ols, anthocyanins, and inflammation. *IUBMB Life* 2, 66(11):745-758.
- Mercadante, A. Z., y Bobbio, F. O. (2008). Anthocyanins in foods: occurrence and physicochemical properties. *Food colorants: Chemical and functional properties*, 241-276.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., y Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 84(4), 407–412.

- Mirabel M., Kahn N., Lagunde-Ammirati L., Glories Y. (1998). *The copigmentation case in model wine solution: application to red wines*. Polyphenol Communications XIXth International Conference on Polyphenols, Lille, France, pp. 341–343.
- Mojica, L., Berhow, M., y de Mejia, E. G. (2017). Black bean anthocyanin-rich extracts as food colorants: Physicochemical stability and antidiabetes potential. *Food chemistry*, 229, 628-639.
- Montoya, G., y Jimenez, N. (2011). False sugar sequence phenomenon and structural analysis of  $\alpha$ -hederin and hederacoside c through electrospray ionization and multi-stage tandem mass spectrometry. *Vitae*, 18(3), 312-318
- Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M. I., Estrada-León, R. J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I. A., Ortiz-Vázquez, E., y Sauri-Duch, E. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food chemistry*, 66, 17-22.
- Morton, J.F. (1987) “Star Apple *Chrysophyllum cainito* L”. *Fruits of warm climates*. Miami: Technology y Engineering, 408-410.
- Musoke B.E., (2002). The uses of plant colours (anthocyanin pigments) and methods to isolate them from plants. 2002, in: Materials of The World’s Women Congress, Makerere University, Uganda, 212–214.
- Ocampo, R., Rios, L. A., Betancur, L. A., y Ocampo, D. M. (2008). *Curso práctico de química orgánica. Enfocado a biología y alimentos*. Universidad de Caldas.
- OFI-CATIE (2012). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- Oranusi, S. U., Braide, W., y Umeze, R. U. (2015). Antimicrobial activities and chemical compositions of *Chrysophyllum cainito* (star apple) fruit. *net journals*, 3(3), 41-50.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.
- Parra C., A. y J.E. Hernández H. (2005). *Fisiología postcosecha de frutas*. Departamento de Ingeniería Civil y Agrícola, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Pathare, P. B., Opara, U. L., y Al-Said, F. A. J. (2013). Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review. *Food and bioprocess technology*, 6(1), 36-60.

- Paulino, C. A. (2017). *Pulpas de frutos patagónicos: procesos, conservación y desarrollo de alimentos funcionales* (disertación doctoral), Facultad de Ciencias Exactas.
- Pazmiño-Durán, A. E., Giusti, M. M., Wrolstad, R. E., y Glória, B. A. (2001). Anthocyanins from oxalis triangularis as potential food colorants. *Food Chemistry*, 75(2), 211–216.
- Peng, Z., Iland, P. G., Oberholster, A., Sefton, M. A., y Waters, E. J. (2010). Analysis of pigmented polymers in red wine by reverse phase HPLC. *Australian Journal of Grape y Wine Research*, 8(1), 70-75.
- Phippen, W. B., y Simon, J. E. (1998). Anthocyanins in Basil (*Ocimum basilicum L.*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(5), 1734–1738.
- Pinela, J., Barros L., Antonio, A., Carvalho, A., Oliveira, M., y Ferreira, I. (2016). Quality Control of Gamma Irradiated Dwarf Mallow (*Malva Neglecta Wallr.*) Based on Color, Organic Acids, Total Phenolics and Antioxidant Parameters. *Molecules* 21(4):467
- Pinela, J., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Carvalho, A. M., Oliveira, M. B. P., Vázquez, J. A., y Ferreira, I. C. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of hydrophilic and lipophilic antioxidants from a surplus tomato crop by response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*, 98, 283-298.
- Pinela, J., Prieto, M. A., Carvalho, A. M., Barreiro, M. F., Oliveira, M. B. P., Barros, L., y Ferreira, I. C. (2016). Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids and production of antioxidant ingredients from tomato: A nutraceutical-oriented optimization study. *Separation and Purification Technology*, 164, 114-124.
- Poei-Langston, M. S., y Wrolstad, R. E. (1981). Color degradation in an ascorbic acid-anthocyanin-flavanol model system. *Journal of Food Science*, 46(4), 1218-1236.
- Popenoe W. “Fruticultura Centroamericana”. *Ceiba* (1953). 3(4):225-338.
- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwan, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., y Mainland, C. M. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of Vaccinium species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46, 2686-2693.
- Quintero, C.,(2004) *Efecto de la copigmentación sobre el color y estabilidad del pigmento en un sistema modelo (bebida), usando antocianina de rábano* (Tesis). México: Instituto de Agroindustrias de una Universidad Tecnológica de la Mixteca.

- Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Rein, M. (2005). *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*. Helsinki: University of Helsinki, 10–14.
- Riha J, Brenner S, Srovnalova A, Klameth L, Dvorak Z, Jager W, Thalhammer T. (2015). Effects of anthocyanins on the expression of organic anion transporting polypeptides (SLCOs/OATPs) in primary human Hepatocytes. *Food Funct.*,6(3):772-779.
- Rojas, F. y G. Torres. (2012). Árboles del valle central de Costa Rica: reproducción caimito (*Chrysophyllum cainito* L.). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*,9(23), 45-46.
- Romualdo, G. R., de Souza, I. P., de Souza, L. V., Prata, G. B., de Campos Fraga-Silva, T. F., Sartori, A., ... y Barbisan, L. F. (2021). Beneficial effects of anthocyanin-rich peels of Myrtaceae fruits on chemically-induced liver fibrosis and carcinogenesis in mice. *Food Research International*, 139, 109964.
- Sablani, S. S., Kasapis, S., y Rahman, M. S. (2007). Evaluating water activity and glass
- Salinas M. Y., Soria R. J. y Espinosa T. E. 2010. Aprovechamiento y Distribución de Maíz Azul en el Estado de México. INIFAP. México, 5
- Salinas Moreno, Y., Aragón Cuevas, F., Ybarra Moncada, C., Aguilar Villarreal, J., Altunar López, B., y Sosa Montes, E. (2013). Caracterización física y composición química de razas de maíz de grano azul/morado de las regiones tropicales y subtropicales de Oaxaca. *Revista fitotecnica mexicana*, 36(1), 23-31
- Sánchez, M. D. L. L. H., Fuentes, A. D. H., Martínez, P. E., Herrera, M. L., y Jiménez, M. A. L. (2009). Caracterización de frutos de caimito (*Chrysophyllum cainito* L.) en el estado de Veracruz, México. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(1), 70-73.
- Sarı, F., Eskizeybek, V., Gülce, H., Gülce, A., y Avcı, A. (2012). Preparation of the new polyaniline/ZnO nanocomposite and its photocatalytic activity for degradation of methylene blue and malachite green dyes under UV and natural sun lights irradiations. *Applied Catalysis B: Environmental*, 119(120), 197-206
- Seeram, N. P., Bourquin, L. D., y Nair, M. G. (2001). Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4924-4929.

- Shailajan, S., y Gurjar, D. (2016). Wound healing activity of *Chrysophyllum cainito* L. leaves: Evaluation in rats using excision wound model. *Journal of Young Pharmacists*, 8(2).
- Shim, S. H., Kim, J. M., Choi, C. Y., Kim, C. Y., y Park, K. H. (2012). Ginkgo biloba extract and bilberry anthocyanins improve visual function in patients with normal tension glaucoma. *Journal of medicinal food*, 15(9), 818-823.
- Shrikhande, A. J., y Francis, F. J. (1974). Effect of flavonols on ascorbic acid and anthocyanin stability in model systems. *Journal of Food Science*, 39(5), 904-906
- Silva, G. J. F., Constant, P. B. L., Figueiredo, R. W., y Moura, S. M. (2010). Formulation and stability of anthocyanins's colorants formulated with peels jaboticaba (*Myrciaria* ssp.). *Brazilian Journal of Food and Nutrition*, 21(3), 429-436.
- Silva, S., Costa, E. M., Calhau, C., Morais, R. M., y Pintado, M. E. (2017). Anthocyanin extraction from plant tissues: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(14), 3072-3083.
- Singleton, V. L., y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Somers, T. C. (1966). Wine tannins isolation of condensed flavonoid pigments by gel-filtration. *Nature*, 209(5021), 368-370.
- Stintzing, F. C., y Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 15(1), 19–38
- Tanaka, Y., y Ohmiya, A. (2008). Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Current opinion in biotechnology*, 19(2), 190-197.
- Timberlake, C. (1980) Anthocyanins-Occurrence, Extraction and Chemistry. *Food Chemistry*, 5(1)69-80
- Toufektsian, M. C., De Lorgeril, M., Nagy, N., Salen, P., Donati, M. B., Giordano, L., Mock, H., Peterek S., Matros, A., Petroni, K., Rotilio, D., Tonelli, C., Leiris J., Boucher, F., Martin, C., y Pihu, R. (2008). Chronic dietary intake of plant-derived anthocyanins protects the rat heart against ischemia-reperfusion injury. *The Journal of nutrition*, 138(4), 747-752.
- transition concepts for food stability. *Journal of Food Engineering*, 78(1), 266–271.
- Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., y Osawa, T. (2003). Dietary cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *The Journal of nutrition*, 133(7), 2125-2130.

- Tura, D., y Robards, K. (2002). Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *Journal of chromatography A*, 975(1), 71-93.
- Vicente-Vicente, L., Prieto, M., y Morales, A. I. (2013). Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *Revista de Toxicología*, 30(2), 171-181.
- Vodovotz, Y., Baik, M., Vittadini, E., y Chinachoti, P. (2000). Instrumental techniques used in bread staling analysis. In *Bread staling* (pp. 105-124). CRC Press.
- Wang, H., Race, E. J., y Shrikhande, A. (2003). Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 1839–1844.
- Wang, W., y Xu, S. (2007). Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*. 82: 271-275.
- Williams, R. S., y Benkeblia, N. (2018). Biochemical and physiological changes of star apple fruit (*Chrysophyllum cainito*) during different “on plant” maturation and ripening stages. *Scientia Horticulturae*, 236, 36-42.
- Wrolstad, R. E., Durst, R. W., y Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science y Technology*, 16(9), 423-428.
- Yoshida K., Kondo T., Kameda K., Goto T., Structure of anthocyanins isolated from purple leaves of *Perilla ocimoides* L. var. *crispa* benth and their isomerization by irradiation of light. *Agric. Biol. Chem.*, 1990, 54, 1745–1751. 106.
- Yoshida K., Mori M., Kawachi M., Okuno R., Kameda K., Kondo T., A UV-B resistant polyacylated anthocyanin, HBA, from blue petals of morning glory. *Tetrahedron Lett.*, 2003a, 44, 7875–7880. 109.
- Yoshida K., Okuno R., Kameda K., Kondo T., Prevention of UV-light induced E,Z-isomerization of caffeoyl residues in the diacylated anthocyanin, gentiodelphin, by intramolecular stacking. *Tetrahedron Lett.*, 2002, 43, 6181–6184. 108.
- Yoshida K., Okuno R., Kameda K., Mori M., Kondo T., Influence of E,Z-isomerization and stability of acylated anthocyanins under the
- Yoshida K., Toyama Y., Kameda K., Kondo T., Contribution of each caffeoyl residue of the pigment molecule of gentiodelphin to blue color development. *Phytochem.*, 2000, 54, 85–92. 107.
- Zambrano, J., Montilla, N., Riveros, R., Quintero, I., Maffei, M., Valera, A., y Materano, W. (2013). Caracterización de frutos de caimito (*Chrysophyllum cainito* L.) variedades verde y

morado e influencia de la época de cosecha en la calidad de los frutos. *Rev. Acad*, 12(27), 287-294.

Zambrano, J., Sarmiento, H., Guerra, G., Caro, A., y Riaño, M. (2011). Estabilidad de Antocianinas en Jugo y concentrado de agraz (*vaccinium meridionale sw.*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 64(1), 6015-6022.

Zapata, L. (2014). *Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria* (disertación doctoral). Universitat Politècnica de València, España.

Zapata, L. M., Castagnini, J. M., Quinteros, C. F., Carlier, E., Veuthey, M. J., y Cabrera, C. (2016). Estabilidad de Antocianinas Durante el Almacenamiento de Jugos de Arándanos. *Vitae*, 23(3), 173-183.

Zeb, Alam (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), e13394

Zou, T. B., Wang, M., Gan, R. Y., y Ling, W. H. (2011). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from mulberry, using response surface methodology. *International journal of molecular sciences*, 12(5), 3006-3017.

Zu, X. Y., Zhang, Z. Y., Zhang, X. W., Yoshioka, M., Yang, Y. N., y Li, J. (2010). Anthocyanins extracted from Chinese blueberry (*Vaccinium uliginosum L.*) and its anticancer effects on DLD-1 and COLO205 cells. *Chinese medical journal*, 123(19), 2714-2719

## ANEXOS

### Anexo A. Rendimiento y pureza del extracto obtenido bajo condiciones óptimas

% rendimiento (mg/100 mL)	% pureza
653.34±7.64	0.57 ±0.00

### Anexo B. Cambio de color CIE del extracto de antocianinas de *Chrysophyllum cainito* L ajustado a distintos valores de pH y almacenamiento a 4 y 25 °C

		Almacenamiento 4 °C		
pH	Parámetro	Tiempo (días)		
		0	21	35
2.5	L*	38.42±2.19	43.33±0.00	40.46±0.00
	a*	62.46±3.41	32.87±2.71	10.66±0.00
	b*	48.48±0.00	13.6±0.00	11.79±0.00
	Tono (°Hue)	37.84±1.5	21.72±1.62	47.88±0.00
	Cromaticidad (C*)	79.08±2.69	35.37±2.52	15.89±0.00
3	L*	28.89±1.32	55.2±2.19	45.07±0.00
	a*	50.32±1.70	24.84±0.00	11.76±0.28
	b*	32.87±1.55	16.98±0.00	7.36±0.00
	Tono (°Hue)	33.16±2.12	34.35±0.88	32.04±0.00
	Cromaticidad (C*)	60.12±0.57	30.08±0.00	13.87±0.23

4.3	L*	36.95±3.25	47.26±0.77	54.84±0.00
	a*	49.65±0.00	34.07±0.00	14.62±0.00
	b*	18.32±1.30	20.77±0.00	12.62±0.00
	Tono (°Hue)	20.24±1.32	30.90±0.00	40.08±0.00
	Cromaticidad (C*)	52.92±0.45	40.44±0.00	19.31±0.00
Almacenamiento 25°C				
		0	2	4
2.5	L*	41.25±0.57	48.15±1.83	57.33 ±3.28
	a*	65.21±.63	49.88±0.00	21.89±0.00
	b*	48.71±4.30	23.80±2.05	8.98±0.00
	Tono (°Hue)	36.72±2.16	25.49±1.92	22.30±0.00
	Cromaticidad (C*)	81.42±3.08	55.28±0.88	23.66±0.00
3.0	L*	41.45±4.46	50.8±1.97	49.17±1.97
	a*	63.93±6.86	41.93±0.00	22.38±2.54
	b*	51.28±0.00	14.87±0.45	6.09±0.00
	Tono (°Hue)	38.83±3.00	19.52±0.54	15.31±1.66
	Cromaticidad (C*)	82.01±5.35	44.48±0.15	23.19±2.45
4.3	L*	30.28±2.94	43.59±2.16	59.03±1.56
	a*	45.13±4.46	32.95±.26	12.21±0.00
	b*	28.06±0.00	16.89±.36	10.55±0.00
	Tono (°Hue)	31.95±2.54	27.13±.31	40.82±0.00
	Cromaticidad (C*)	53.17±3.78	37.02±.40	16.13±0.00

**Anexo C.** Contenido de antocianinas de *C. cainito* durante cinco semanas de almacenamiento en refrigeración y temperatura a 25°C

		Tiempo (días)						
Temp ertura °C	pH	0	7	14	21	28	35	
		4	2.5	2.99±0.23	1.23±0.33	0.572±0.25	0.30±0.15	0.19±0.09
3.0	3.24±0.12		1.46±0.17	0.79±0.12	0.44±0.12	0.29±0.11	0.19±0.05	
4.3	3.22±0.03		2.83±0.04	2.55±0.11	2.20±0.03	1.98±0.09	1.78±0.09	
		0	0.5	1	2	3	4	
30	2.5	3.37±0.19	2.5±0.04	1.76±0.03	1.00±0.12	0.63±0.08	0.32±0.10	
	3	3.70±0.04	2.6±0.00	1.79±0.06	1.12±0.00	0.76±0.03	0.42±0.00	
	4.3	3.70±0.03	3.32±0.04	3.01±0.03	2.61±0.05	2.32±0.09	1.97±0.07	

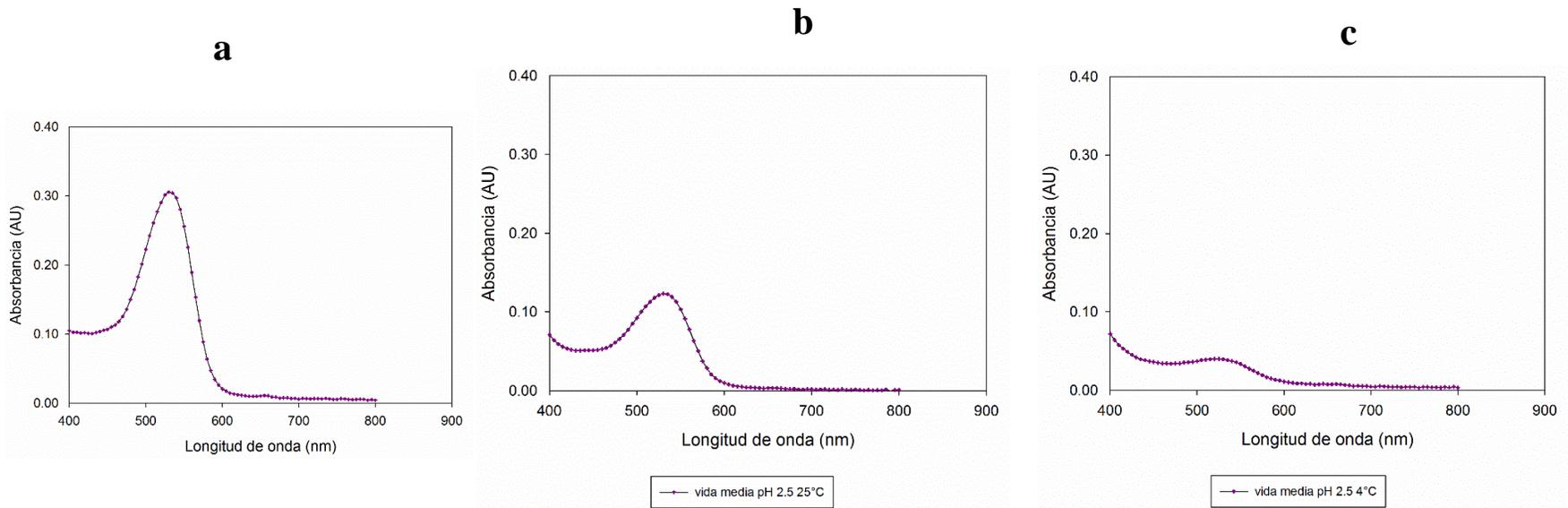
**Anexo D.** Cambio de color CIE del extracto de *Chrysophyllum cainito* L. ajustado a diferentes valores de pH y almacenados a 4°C

		Color					
Temperatura (°C)	pH	Tiempo (días)					
		0	7	14	21	28	35
4	2.5						
	3.0						
	4.3						

**Anexo E.** Cambio de color CIE de extracto de *Chrysophyllum cainito* L. ajustado a diferentes valores de pH y almacenados a 25°C

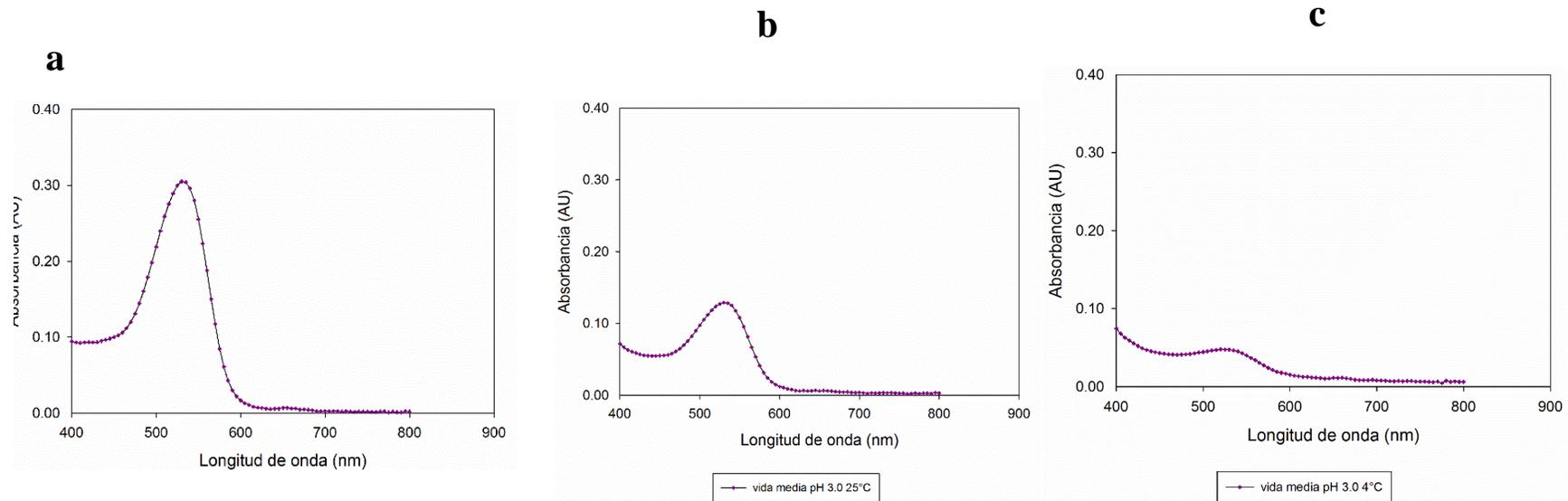
		Color					
Temperatura (°C)	pH	Tiempo (días)					
		0	0.5	1	2	3	4
30	2.5						
	3						
	4.5						

**Anexo F.** Espectro de absorción de antocianinas del extracto *C. cainito* ajustado a pH 2.5, almacenado a 4 °C y 25°C.



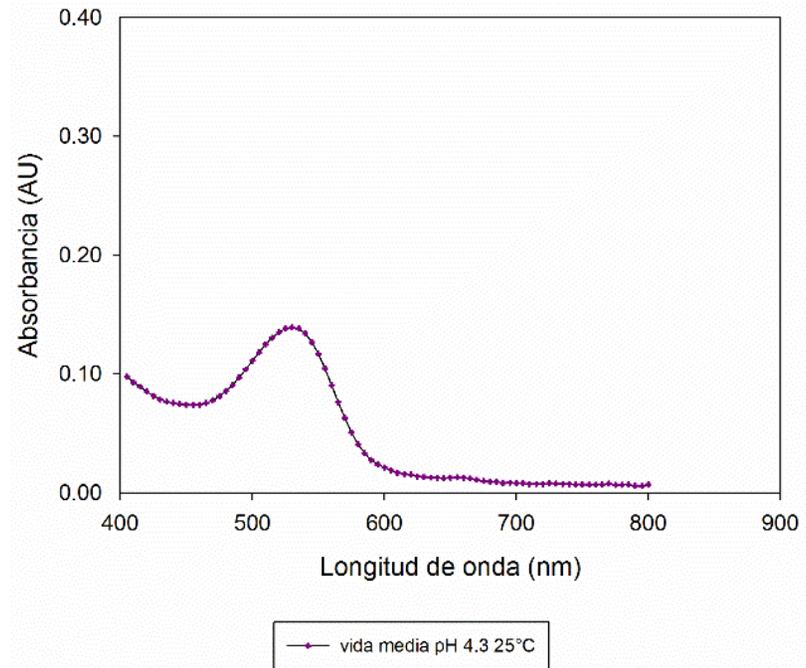
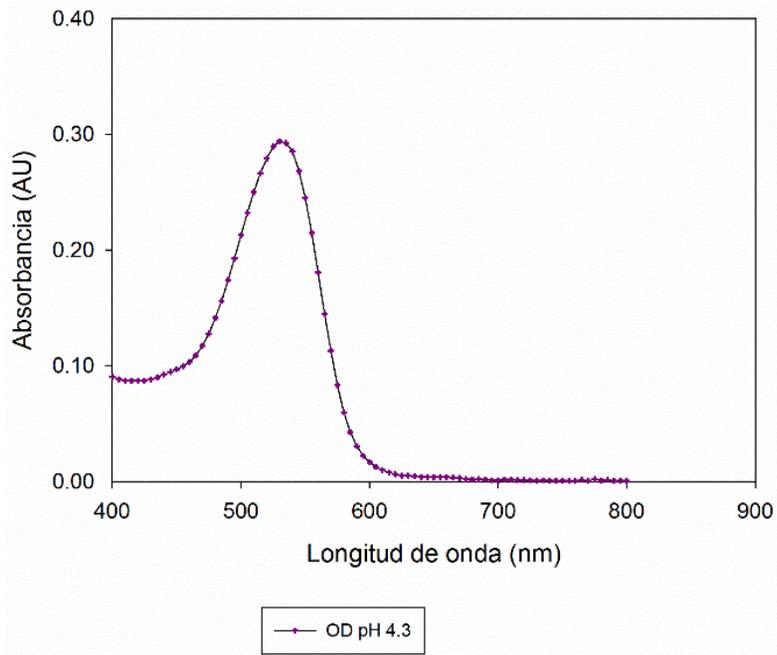
Nota: Donde a= tiempo 0, b= extracto a 1.19 días a 25°C; c= extracto a 7.79 días a 4°C.

**Anexo G** .Espectro de absorción de antocianinas del extracto de *C. cainito* ajustado a pH 3, almacenado a 4 °C y 25°C..



Nota : Donde a= tiempo 0, b= extracto a 1.38 días a 25°C; c= extracto 8.73 días a 4°C

**Anexo H .** Espectro de absorción de antocianinas del extracto *C. cainito* ajustado a pH 4.3, almacenado a 4 °C y 25°C.



Nota : Donde a= tiempo 0, b= extracto a días a 25°C

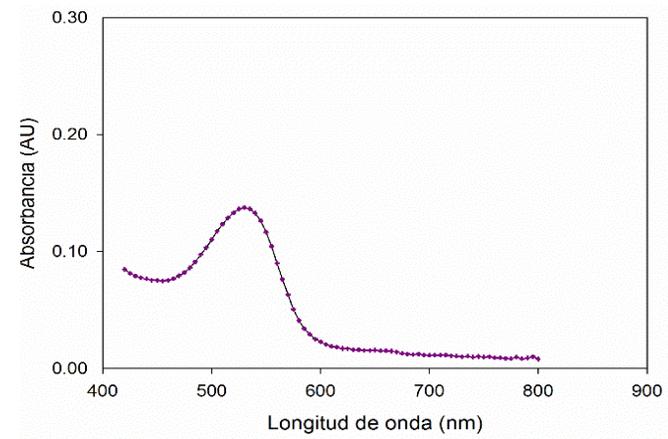
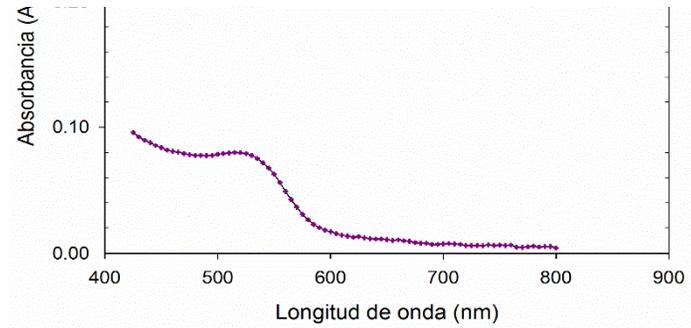
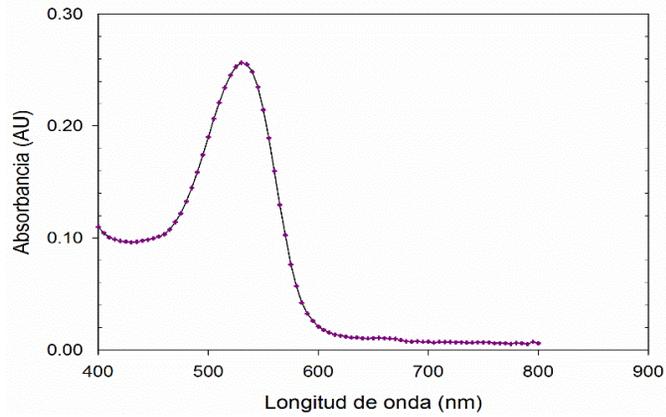
**Anexo I.** Cambio de color del extracto de antocianinas de *Chrysophyllum cainito* L. ajustado a pH de 4.3, almacenado a 25°C en presencia y ausencia de luz

Tiempo (días)	0		0.5		1		1.5		2		2.5		5	
	Luz		Sin Luz		Luz		Sin Luz		Luz		Sin Luz		Luz	
L*	35.67±1.90	26.86±0.5	29.54±0.00	30.54±1.44	35.22±0.02	34.13±2.5	34.79±0.53	35.32±2.64	35.79±0.00	42.70±3.25	46.04±0.84	50.69±0.16	49.93±4.11	
a*	48.99±0.17	47.6±0.07	46.00±5.84	44.90±0.59	51.69±1.97	47.44±1.10	50.74±0.48	41.46±1.08	43.94±2.13	44.73±0.10	46.20±1.01	22.705±1.50	20.09±2.23	
b*	20.25±2.77	37.70±0.57	30.04±0.00	33.72±0.01	30.47±0.00	40.80±3.84	33.00±0.13	33.42±0.89	23.25±1.61	41.40±0.15	20.71±0.00	48.82±2.82	12.15±1.46	
Tono (°Hue)	22.43±2.70	38.38±0.47	33.29±3.35	36.91±0.38	30.53±0.96	40.64±2.01	33.04±0.36	38.87±0.02	27.92±2.79	42.78±0.04	24.15±0.47	65.01±2.72	31.16±0.23	
Cromaticidad (C*)	53.05±1.22	60.73±0.29	54.99±4.89	56.15±0.47	60.01±1.70	62.59±3.34	60.53±0.34	53.26±1.40	49.74±1.13	60.95±0.18	50.63±0.92	53.87±1.93	23.48±2.67	

**Anexo J.** Cambio de color del extracto de antocianinas de *Chrysophyllum cainito* L. ajustado a pH de 4.3 almacenado a 25°C en presencia y ausencia de luz

Tiempo (días)	0	1.5		5	
Parámetros		Luz	Sin Luz	Luz	Sin Luz
L*	35.67±1.90	34.13±2.58	34.79±0.53	50.69±0.16	49.93±4.11
a*	48.99±0.17	47.44±1.10	50.74±0.48	22.705±1.50	20.09±2.23
b*	20.25±2.77	40.80±3.84	33.00±0.13	48.82±2.82	12.15±1.46
Tono (°Hue)	22.43±2.70	40.64±2.01	33.04±0.36	65.01±2.72	31.16±0.23
Cromaticidad (C*)	53.05±1.22	62.59±3.34	60.53±0.34	53.87±1.93	23.48±2.67

**Anexo K.** Espectro de absorción de antocianinas del extracto *C. cainito* ajustado a pH 4.3, almacenado en presencia o ausencia de luz a 30°C.



**Nota :** Donde a= tiempo 0, b= extracto sin presencia de luz a 2.5 días; c= extracto expuesto a luz (20W) 2.5 días.