



Universidad del Azuay
Facultad de Ciencia y Tecnología

Escuela de Ingeniería en Alimentos

*Caracterización de los compuestos fenólicos de plantas alimenticias
nativas de la Sierra Ecuatoriana por métodos instrumentales*

Trabajo de graduación previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos

Autor:

Guamán Bautista Linda Priscila

Director:

Dra. María Elena Cazar Ramirez.

Cuenca-Ecuador

2009

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a Dios quien ha sido el mejor de los maestros a lo largo de estos años de estudio.

A Rosa y Gustavo, mis padres, por su apoyo incondicional y por creer en todos mis sueños.

A Pablo por su presencia en mi vida y su amor.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a la Dra. M^a Elena Cazar por su amistad, y en especial porque me enseñó que el conocimiento no es de quien lo posee sino de quien lo necesita.

De igual manera mis agradecimientos al Dr Piercósimo Tripaldi por su ayuda y por aportar con sus conocimientos para la elaboración de éste trabajo de tesis.

Y de manera muy especial a Ximena, Diego y M^a Fernanda por su confianza y por hacer de mis actividades en el laboratorio un espacio de aprendizaje y compartir.

RESUMEN

El propósito del presente trabajo fue caracterizar los compuestos fenólicos de cuatro especies vegetales: Ataco (*Amaranthus caudatus* Linnaeus), Maíz Morado (*Zea mays*), Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) y Mortiño (*Solanum nigrum*).

Se utilizaron técnicas cromatográficas para establecer el patrón de compuestos fenólicos y separar las fracciones correspondientes. Los compuestos mayoritarios fueron sometidos a técnicas de separación preparativa. Las fracciones obtenidas por Cromatografía preparativa fueron caracterizadas por sus máximos de absorción y sus desplazamientos bato e hipsocrómicos mediante reactivos específicos. Mediante el uso de métodos quemiométricos se confrontaron los resultados obtenidos con referencias bibliográficas y se identificó la presencia de Isoflavonas y antocianinas en las especies estudiadas.

ABSTRACT

The aim of this work was to characterize phenolic compounds from four edible species: Black nightshade (*Solanum nigrum*), purple corn (*Zea mays*), amaranth (*Amaranthus caudatus*), and blackberry (*Vaccinium floribundum*)

Chromatographic techniques were used to separate and purify fractions with phenolic compounds. The extracts obtained were submitted to preparative separation techniques. Fractions obtained by preparative chromatography were characterized for its absorption maximum and its bathochromic and hipsochromic shifts using specific reagents.

The use of chemometrics methods allowed us to compare our results with reported shifts of phenolics. As a result of this work we identified and Isoflavones and Anthocianines in the edible species studied.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|-----|
| Dedicatoria..... | II |
| Agradecimientos..... | III |
| Resumen..... | IV |
| Abstract..... | V |
| Índice de contenidos..... | VI |
| Índice de Anexos..... | IX |
| | |
| Introducción..... | 11 |
| CAPÍTULO 1: COMPUESTOS FENÓLICOS | |
| Introducción..... | 14 |
| 1.1 Conceptos y generalidades..... | 14 |
| 1.2 Clasificación..... | 15 |
| 1.3. Características físico químicas y moleculares de los compuestos fenólicos..... | 16 |
| 1.4 Rol de los compuestos fenólicos en el metabolismo secundario Vegetal..... | 17 |
| 1.5 Potenciales aplicaciones de los compuestos fenólicos como aditivos de alimentos..... | 18 |
| 1.6 Determinación de compuestos fenólicos por métodos espectrofotométricos..... | 19 |
| Conclusiones..... | 21 |
| | |
| CAPÍTULO 2: ESPECIES SELECCIONADAS | |
| Introducción..... | 22 |
| 2.1 Ataco (<i>Amaranthus caudatus</i> Linnaeus)..... | 22 |
| 2.1.1 Descripción Botánica..... | 22 |
| 2.1.2 Composición..... | 23 |

| | |
|---|----|
| 2.1.3 Propiedades..... | 23 |
| 2.2 Maíz Morado (<i>Zea Mays</i>)..... | 24 |
| 2.2.1 Descripción científica..... | 24 |
| 2.2.2 Composición..... | 25 |
| 2.2.3. Propiedades..... | 25 |
| 2.3 Mortiño (<i>Vaccinium floribundum Kunth</i>)..... | 26 |
| 2.3.1 Descripción Botánica..... | 26 |
| 2.3.2 Composición..... | 27 |
| 2.3.3 Propiedades..... | 27 |
| 2.4 Mortiño (<i>Solanum Nigrum</i>)..... | 28 |
| 2.4.1 Descripción Botánica | 28 |
| 2.4.2Composición..... | 29 |
| 2.4.3 Propiedades | 29 |
| Conclusiones..... | 30 |

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|---|----|
| Introducción..... | 31 |
| 3.1 Selección y preparación del material vegetal..... | 31 |
| 3.2 Obtención de extractos..... | 33 |
| 3.2.1 Método de Soxhlet para obtención de extracto de maíz morado..... | 33 |
| 3.2.2 Método de Macerado para la obtención de extractos de Ataco y Mortiño..... | 34 |
| 3.3 Identificación del perfil de Compuestos fenólicos por Cromatografía en Capa Fina Analítica..... | 36 |
| 3.4 Separación de Compuestos fenólicos por Cromatografía en Capa Fina preparativa..... | 38 |
| 3.5 Determinación de las propiedades espectroscópicas en espectroscopia UV..... | 39 |
| 3.6 Desplazamientos batocrómicos e hipsocrómicos..... | 41 |
| 3.7 Determinación de antocianos en maíz morado y mortiño (<i>V. floribundum</i>) por espectroscopía UV Vis..... | 42 |
| 3.8 Análisis estadístico de datos..... | 44 |
| Conclusiones..... | 45 |

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

| | |
|--|----|
| Introducción..... | 46 |
| 4.1 Identificación de compuestos fenólicos por datos bibliográficos de Rf especificados por la técnica..... | 46 |
| 4.2 Comparación de patrones espectroscópicos de los fenólicos aislados con datos bibliográficos..... | 47 |
| 4.3 Análisis de Componentes principales para las fracciones aisladas de las especies en estudio..... | 48 |
| 4.4 Análisis de Antocianinas en extractos totales de <i>Zea Mays</i> y <i>Vaccinium Floribundum</i> | 51 |
| 4.5 Identificación de antocianidinas para las fracciones aisladas de <i>Zea mays</i> ecotipos 1 y 2 y <i>Vaccinium floribundum</i> | 52 |

CAPITULO 5: DISCUSION

| | |
|--|----|
| 5.1 Análisis de Rf de los perfiles cromatográficos de las fracciones obtenidas de los extractos en estudio..... | 55 |
| 5.2 Comportamiento de los reactivos de desplazamiento en moléculas orgánicas..... | 55 |
| 5.2.1 Reacción de desplazamiento con Ácido Bórico..... | 56 |
| 5.2.2 Reacción de desplazamiento con Cloruro de Aluminio..... | 56 |
| 5.3 Comportamiento de las fracciones de extractos estudiados con reactivos de desplazamiento..... | 57 |
| 5.4 Estudio de antocianinas en extractos totales de las especies en estudio...57 | |
| 5.5 Identificación de compuestos fenólicos en las fracciones obtenidas de los extractos por análisis de componentes principales..... | 58 |
| 5.6 Identificación de las antocianinas por análisis de desplazamientos químicos en extractos totales de <i>Zea Mays</i> y <i>Vaccinium Floribundum</i> | 59 |

| | |
|--|-----------|
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 61 |
|--|-----------|

| | |
|--------------------|-----------|
| ANEXOS..... | 62 |
|--------------------|-----------|

| | |
|--------------------------|-----------|
| BIBLIOGRAFIA..... | 72 |
|--------------------------|-----------|

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo 1: Matriz de datos en base a la comparación del patrón de desplazamientos químicos y máximos de absorción de <i>Solanum Nirgrum</i> y <i>V. Floribundum</i> Fracciones Fluorescentes..... | 66 |
| Anexo 2: Matriz de datos en base a la comparación del patrón de desplazamientos químicos y máximos de absorción de <i>Zea Mays</i> ecotipos 1 y 2 Fracciones Fluorescentes..... | 67 |
| Anexo 3: Matriz de datos en base a la comparación del patrón de desplazamientos químicos y máximos de absorción de <i>Amaranthus Caudatus</i> Fracciones Fluorescentes..... | 68 |
| Anexo 4: Matriz de datos en base a la comparación del patrón de desplazamientos químicos y máximos de absorción de <i>Amaranthus Caudatus</i> Fracciones Moradas..... | 69 |
| Anexo 5: Matriz de datos de Antocianinas en base a la comparación del patrón de desplazamientos químicos y máximos de absorción de <i>Zea mays</i> ecotipos 1 y 2 y <i>Vaccinium Floribundum</i> | 70 |
| Anexo 6: Espectro de absorción UV de <i>Solanum Nigrum</i> Fracción 1. Fluorescentes..... | 71 |
| Anexo 7: Espectro de absorción UV de <i>Solanum Nigrum</i> Fracción 2. Fluorescentes..... | 71 |
| Anexo 8. Espectro de absorción UV de <i>Vaccinium Floribundum</i> Fracción 1. Fluorescentes..... | 72 |

| | |
|--|----|
| Anexo 9: Espectro de absorción UV de Amaranthus Caudatus Fracción 1. Fluorescentes..... | 72 |
| Anexo 10. Espectro de absorción UV de Amaranthus Caudatus Fracción 2. Fluorescentes..... | 73 |
| Anexo 11. Espectro de absorción UV de Zea Mays, ecotipo 1 Fracción 1. Fluorescente..... | 73 |
| Anexo 12. Espectro de absorción UV de Zea Mays, ecotipo 1 Fracción 2 Fluorescente..... | 74 |
| Anexo 13. Espectro de absorción UV de Zea Mays, ecotipo 2 Fracción 1..... | 74 |
| Anexo 14: Espectro de absorción UV de Amaranthus Caudatus Fracción 1. Violeta..... | 75 |
| Anexo 15: Espectro de absorción UV de Amaranthus Caudatus Fracción 2. Violeta..... | 75 |

Guamán Bautista, Linda Priscila

Trabajo de Graduación

Cazar Ramírez, Ma. Elena

Abril del 2009

**CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE PLANTAS
ALIMENTICIAS NATIVAS DE LA SIERRA ECUATORIANA POR
MÉTODOS INSTRUMENTALES**

INTRODUCCIÓN

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos tiene interés desde un punto de vista tecnológico y nutricional. Así, los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales de los alimentos, por lo que la obtención y preparación de alimentos con un alto contenido en estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes, a la vez que se obtienen alimentos más saludables, que incluso pueden llegar a englobarse dentro de los alimentos funcionales. Desde un punto de vista nutricional, esta actividad antioxidante se asocia con su papel protector en las enfermedades cardiovasculares y en el cáncer así como en procesos de envejecimiento por lo que está siendo intensamente estudiado mediante ensayos "in vivo" e "in vitro".

Los flavonoides y los ácidos fenólicos son los que reciben mayor atención como agentes potenciales antioxidantes, debido fundamentalmente a su amplia presencia en un alto número de alimentos de gran consumo.

Por otro lado los pigmentos fenólicos (antocianinas) pueden ser usados en productos ácidos donde se desee un color rojo, de hecho, al colorante de maíz morado se le clasifica con el número E-163 (EEC), por lo que

actualmente es de interés caracterizar los compuestos fenólicos presentes en diversas plantas para la elaboración de colorantes para bebidas, jaleas, gelatinas, etc.

En nuestro país, encontramos gran diversidad de plantas alimenticias nativas, como el maíz morado, mortiño y ataco, las cuales contienen compuestos fenólicos de gran interés tanto por sus propiedades nutricionales como por su potencial uso como colorantes en la industria alimentaria. Por estas razones, la caracterización del perfil de compuestos fenólicos en estos alimentos tradicionales es un tema de investigación interesante, tanto para los consumidores como para potenciales usos en industrias alimenticias.

El presente trabajo de investigación fue planteado con los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar el perfil de compuestos fenólicos presentes en: *Amaranthus caudatus Linnaeus* (Ataco), *Zea mays L* (maíz morado), y *Vaccinium floribundum Kunth L* (mortiño), utilizando métodos de cromatografía, espectrofotometría UV vis y reactivos de desplazamientos hipso y batocrómicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener extractos orgánicos de *Amaranthus caudatus Linnaeus* (Ataco), *Zea mays L* (maíz morado), y *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño).
- Establecer las condiciones adecuadas de separación cromatográfica para éstos extractos.
- Evaluar los parámetros cromatográficos y máximos de absorción UV para las separaciones obtenidas.

- Evaluar las características de los grupos cromóforos de los compuestos fenólicos mediante desplazamientos batocrómicos e hipsocrómicos
- Comparar los datos experimentales con las referencias bibliográficas, con el fin de caracterizar los compuestos fenólicos.

CAPITULO 1

COMPUESTOS FENOLICOS

Introducción

En este capítulo se abordarán todos los conceptos relacionados con los compuestos fenólicos, sus generalidades, clasificación y características, así como su rol en el metabolismo secundario vegetal y sus potenciales aplicaciones como aditivos de alimentos.

1. 1 Concepto y generalidades

El término “Compuesto Fenólico”, abarca un amplio rango de sustancias presentes en plantas, las cuales poseen una estructura química conformada por un anillo aromático en común relacionado con grupos hidroxilos. Las sustancias fenólicas tienden a ser solubles en agua, por lo que se encuentran mas frecuentemente combinadas con azúcares en forma de glucósidos. La mayoría de los fenoles son sólidos y su color varía desde incoloro hasta fuertemente coloreado, dependiendo de la conjugación del o los cromóforos presentes. El análisis de estos compuestos por espectroscopía Ultra-Violeta muestra su capacidad de absorber la luz en la región visible y ultravioleta, y sus espectros son afectados por reactivos de desplazamiento de manera característica. De entre los compuestos fenólicos naturales, los flavonoides forman el más grande grupo. (Martínez, 2005)

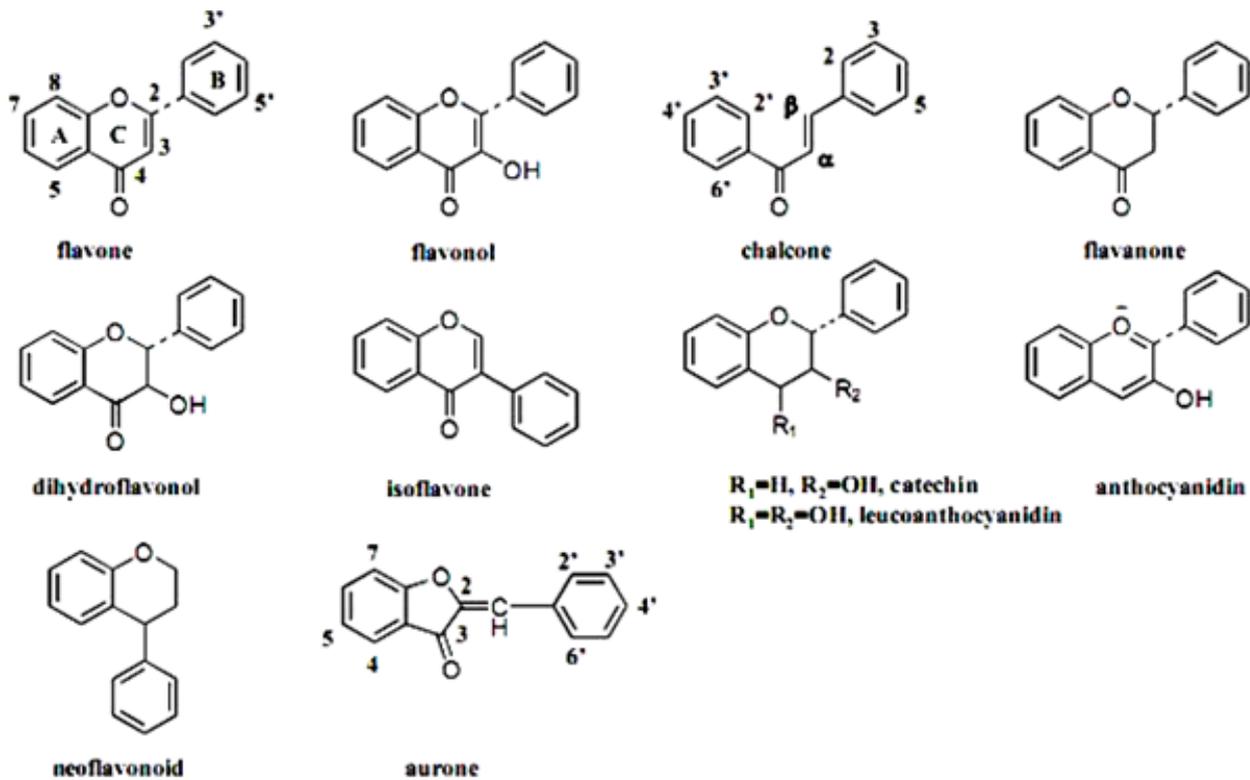


Figura 1. Diversidad de estructuras de compuestos fenólicos. Fuente: Harborne, 1998

1.2 Clasificación

Por su estructura química, los compuestos fenólicos pueden clasificarse en los siguientes grupos:

- Compuestos Fenólicos Simples: C6C1, C6C2, C6C3.
- Flavonoides, chalconas, antocianinas
- Isoflavonoides, isoflavonas, isoflavanonas, rotenoides, isoflavanos e isoflavenos
- Quinonas benzoquinona, naftoquinona, antraquinona, bis-antraquinona
- α -Pironas cumarinas, isocumarinas, aflatoxinas
- γ -Pironas cromanos y cromonas, cannabinoides
- Xantonas
- Lignoides
- Otros policétidos aromáticos (Fossen, 2001)

1.3 Características físico químicas y moleculares de los compuestos fenólicos

Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático, un anillo bencénico, con uno o más grupos hidróxidos incluyendo derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.).

La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Se presentan en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos. Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. Entre estos, los más frecuentes son glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, y ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos. (Harborne, 1998).

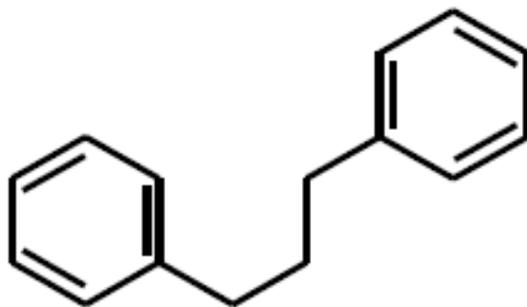


Figura 2. Estructura básica de un flavonoide. (Fuente Harborne, 1998)

1.4 Rol de los compuestos fenólicos en el metabolismo secundario vegetal

Generalmente todos los vegetales, como producto de su metabolismo secundario normal, son capaces de biosintetizar un elevado número de compuestos fenólicos, algunos de los cuales son indispensables para sus funciones fisiológicas y otros son de utilidad para defenderse ante situaciones de estrés hídrico, luminoso, etc. (Mabry, 1970)

En el metabolismo vegetal estos compuestos cumplen funciones variadas, entre ellas: defensa ante otras especies, pigmentación de flores y contribución sustancial a ciertos sabores de frutos.

Se tienen algunas evidencias experimentales que sugieren que los compuestos fenólicos cumplen una o varias de las siguientes funciones:

- Su capacidad de absorber ciertas radiaciones ultravioleta, los convierte en filtros solares para proteger los tejidos vegetales de radiaciones dañinas, y además se ha sugerido que participan en el proceso de la fotosíntesis.
- Sus variados colores y su presencia en tejidos como los de las flores, sugieren que participan en procesos como la reproducción favoreciendo la atracción de insectos polinizadores.
- Las diferentes actividades biológicas halladas para algunos de los flavonoides (antimicrobiana, antimicótica, etc.) y las evidencias experimentales de que algunos aumentan la resistencia de ciertas plantas contra diferentes infecciones y enfermedades vegetales (es decir que actúan como fitoalexinas), sugieren que estas sustancias también son un mecanismo químico de defensa vegetal.
- La capacidad inhibidora de ciertas hormonas vegetales presentada por algunos flavonoides sugiere que actúan como reguladores del crecimiento vegetal. (Wang, 2000)

1.5 Potenciales aplicaciones de los compuestos fenólicos como aditivos de alimentos

La industria de colorantes es una rama que, debido a los controles cada vez más exigentes respecto al uso de colorantes artificiales en alimentos, por ejemplo por sus efectos cancerígenos, esta impulsando en el ámbito mundial el uso de colorantes naturales. A partir del maíz morado se puede obtener un colorante natural, la antocianina, mejorada por un proceso de selección que permite incrementar la concentración de este color. (Calderón, 1992)

Además, la industria de alimentos usa antioxidantes para prevenir el deterioro de la calidad de algunos productos, sobre todo los de alto contenido en grasas y lípidos, y mantener así su valor nutritivo. Estos antioxidantes son en su mayoría sintéticos, como terbutil-hidroxitolueno (BHT), terbutil-hidroxianisol (BHA), galato de propilo (PG), galato de dodecilo (DG) y terbutil-hidroquinona terciaria (TBHQ). (Rice, 1996).

La actividad antioxidante de extractos vegetales ha sido asociada con la presencia de compuestos fenólicos, como ácidos fenólicos, flavonoides y taninos. Actualmente, existe un creciente interés en la evaluación de extractos de partes áreas vegetales como una fuente potencial de antioxidantes de uso en formulaciones alimenticias. Recientemente, se ha reportado actividad antioxidante en extractos fenólicos de diversos tipos de berries (fresas, moras y frambuesas), lo cual muestra el potencial de estas matrices vegetales como fuentes de compuestos antioxidantes aprovechables en la industria de alimentos (Cao, 1997)

La actividad antioxidante de los polifenoles se debe a su facilidad para reducir la producción de radicales libres, bien por inhibición de las enzimas que intervienen, bien por quelación con los metales de transición responsables de la generación de los radicales libres. Además, los

flavonoides por su bajo potencial redox, son capaces de reducir las especies de oxígeno reactivo (ROS), altamente oxidadas. En general los compuestos polifenólicos como antioxidantes, son multifuncionales y actúan según la mayoría de los mecanismos mencionados. Los polifenoles de tipo flavonoideo, como flavonoles, flavonas, isoflavonas, antocianos, flavanonas, catequinas y proantocianidinas, son los antioxidantes más potentes presentes en los alimentos vegetales. (Wang, 1996).

1.6 Determinación de compuestos fenólicos por métodos espectrofotométricos.

Los compuestos fenólicos generalmente absorben en la región visible y ultravioleta, y sus espectros son afectados por reactivos de desplazamiento de manera característica. Los espectros UV de éstos compuestos en metanol presentan bandas de identificación debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos.

La espectrofotometría UV visible es ampliamente usada por requerir solo pequeñas cantidades del compuesto puro, el cual no se destruye, al igual que para el NMR. El espectro UV de un flavonoide se relaciona con su estructura de la siguiente manera:



Figura 3. Espectro UV de un flavonoide. Fuente (Harborne, 1998)

El espectro en metanol de los flavonoides da información sobre el tipo de flavonoide y el estado de oxidación. El máximo de absorción de los flavonoides varía de acuerdo al estado de oxidación del anillo central y

según el número y posición de los grupos OR, como resultado de los diferentes sistemas conjugados. El empleo de reactivos de desplazamientos como metóxido de sodio, cloruro férrico, acetato de sodio y ácido bórico, producen corrimientos de los máximos de absorción de acuerdo a la localización y naturaleza de las funciones oxigenadas. (Echeverri, 1986)

Las flavonas y flavonoles muestran dos bandas definidas: La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamoílo, y la banda II, entre 250-280 nm debida al anillo aromático A (funcionalidad benzoílo), aunque a veces se observan otras bandas de absorción. La posición de la banda I depende del tipo de flavonoide: las flavonas la muestran en 310-350 nm, los flavonoles 3-O-sustituidos en 330- 360 nm, y los flavonoles en 350-385 nm. La presencia de hidroxilos fenólicos en diferentes posiciones de la molécula puede establecerse estudiando el comportamiento del espectro UV metanólico al añadirle los denominados reactivos de desplazamiento. (Markham, 1982)

En el caso de las antocianinas a ciertos pH's presentan diferente actividad debido a que esto repercute en su estabilidad molecular. Los espectros UV-VIS a diferentes pH también cambian y nos ayudan a determinar si está o no polimerizada.

El color llamativo de las antocianinas se debe principalmente a la carga positiva del catión flavilio. A pH 1 dará un color intenso tal como se encuentran de forma típica en frutas y verduras. Las cargas van cambiando a lo largo de la variación del pH. El catión flavilio a pH 1 es la forma más estable mientras que las chalconas a pH's mayores a 4.5 son las más susceptibles a degradación. (Giusti y Wrolstad, 2001)

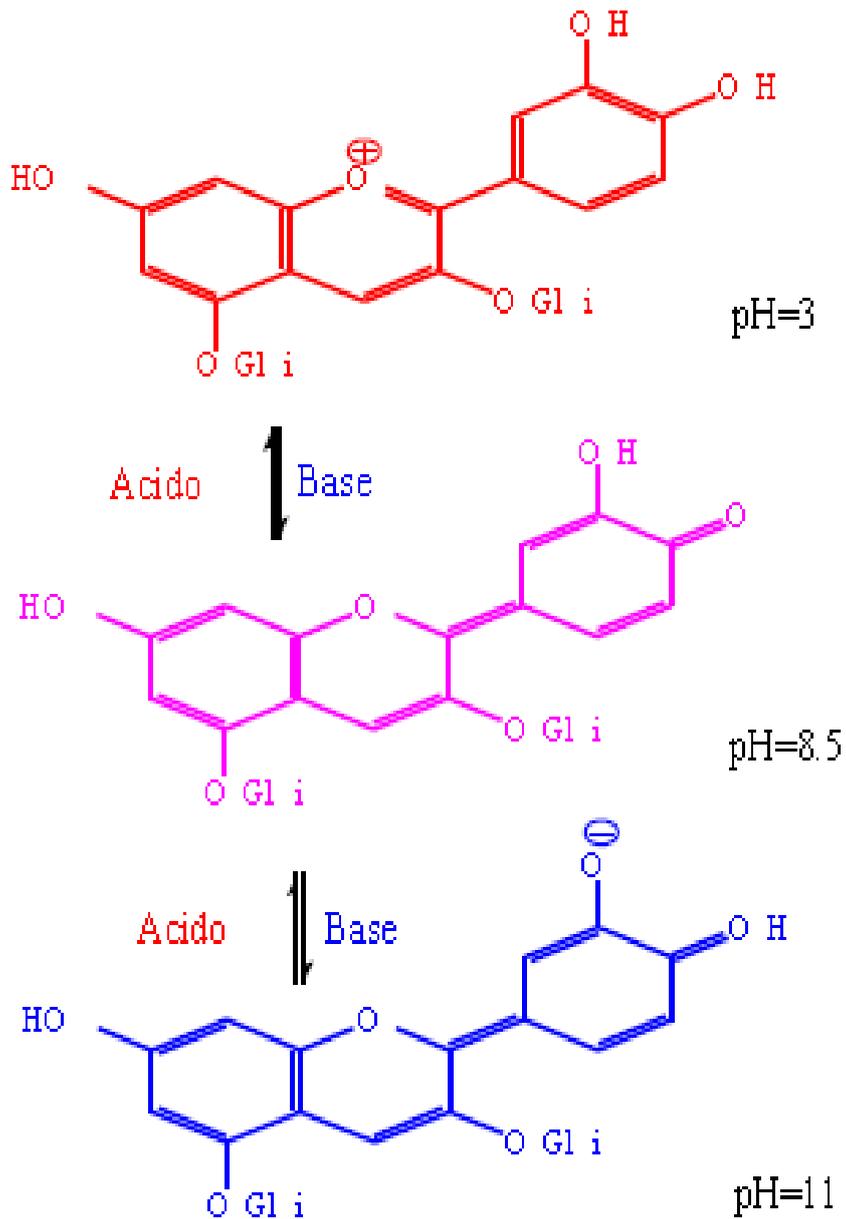


Figura 4. Formas de Antocianinas a diferentes pH's. (Giusti y Wrolstad 2001)

Conclusiones

El presente capítulo comprende una visión general de los compuestos fenólicos, el cual abarca desde los conceptos más generales de éstas estructuras químicas, hasta su determinación por espectrofotometría, haciendo una primera aproximación del trabajo a desarrollar. Éste fundamento permite conocer el alcance del trabajo desarrollado.

CAPITULO 2

ESPECIES VEGETALES SELECCIONADAS

Introducción

En este capítulo se describen las principales características botánicas de las especies en estudio. Además se reporta su composición y características específicas relacionadas a sus usos y potenciales en aplicaciones alimenticias.

2.1 Ataco (*Amaranthus caudatus* Linnaeus)



Figura 5: Planta de Ataco

2.1.1 Descripción Botánica

Clasificación Científica: El Ataco o Kiwicha pertenece a la familia de las Amarantáceas

Nombre científico: *Amaranthus caudatus* Linnaeus

Nombres comunes: amaranto, kiwicha, ataco.

El Ataco es un vegetal ampliamente difundido por todo el territorio ecuatoriano debido a su capacidad de adaptación a cualquier ambiente, pero se reconoce como nativo de los andes ya que es originario de las regiones incaicas, su aparición fue detectada en tumbas con más de 4000 años de edad.

Es una planta anual dicotiledónea de hoja ancha, muchas variedades maduran entre los 4 a 6 meses pero en algunas tierras altas es posible que su madurez se alcance a los 10 meses. El consumo en Ecuador es en infusión como té medicinal. (White, 1986)

2.1.2 Composición

| COMPOSICION POR 100 G DE ATACO (CON SEMILLA) | |
|---|------|
| Calorías (Kcal) | 391 |
| Proteína (g) | 14.5 |
| Grasa (g) | 6.4 |
| Cenizas (mg) | 2.6 |
| Carbohidratos (g) | 71.5 |
| Calcio (mg) | 451 |

Cuadro 1. Composición nutricional Ataco. Fuente Chacón, 1997

2.1.3 Propiedades

El Ataco es una planta de la cual se aprovechan todas sus partes tanto con propósitos nutricionales como medicinales.

Las hojas cocidas son generalmente son utilizadas en procesos inflamatorios de la vejiga y dolores reumáticos.

Además la cocción de las raíces se emplea contra la diarrea, en tanto que los tallos también son utilizados en infusión como un efectivo laxante.

El cocimiento de las hojas en gárgaras es útil contra la irritación de boca y garganta (White, 1986)

2.2 Maíz Morado (*Zea Mays*)



Figura 6: Fruto de Maíz morado

2.2.1 Descripción científica

Clasificación Científica: El Maíz Morado pertenece a la familia de las Gramíneas. Especie: *Zea mays*.

Nombre científico: *Zea mays* L.

Nombres comunes: Maíz Morado.

El Maíz Morado, denominado científicamente *Zea mays* L. es una variedad de maíz que posee la coronta y los granos de color morado. En su composición se encuentran compuestos del grupo de las antocianinas.

Esta planta está constituida por un eje central, sostenido por un sistema radical fibroso y compacto. El eje o tallo, ordinariamente produce varios brotes basales; sus ramificaciones laterales son muy comprimidas, y forman las mazorcas o inflorescencias pistiladas.

La separación de las flores pistiladas y estaminadas en el maíz, fue para los naturalistas europeos anteriores al conocimiento del mecanismo de la polinización, un objeto de maravilla, pues no se explicaban como una planta

podía llevar las flores en el ápice y formar sus frutos en las ramas inferiores. (Lazo, 1999)

2.2.2 Composición

| COMPOSICION NUTRICIONAL EN 100 G DE MAIZ | |
|---|--------|
| Materia Seca | 88.00% |
| Proteína Cruda | 0.90% |
| Grasa | 3.50% |
| Fibra Cruda | 2.90% |
| Calcio | 0.01% |
| Fósforo total | 0.25% |
| Cenizas | 1.50% |

Cuadro 2. Composición Nutricional de Maíz. Fuente: Feedstuffs ingredient analysis table 1987

2.2.3. Propiedades

En los últimos años, los científicos han demostrado que muchos de los pigmentos que dan su color a las frutas y vegetales, contienen muchos de los compuestos que parecen combatir enfermedades degenerativas del cuerpo humano y que a su vez, brindan efectos benéficos para la salud y el bienestar. Tal es el caso de las antocianinas que el Maíz Morado posee en alta proporción. (García,1992)

Existen reportes de diferentes efectos beneficiosos en la salud asociados con el consumo de maíz morado, entre los cuales se cita el control de la presión sanguínea, niveles de colesterol, mejoramiento de la circulación y protección de vasos sanguíneos ante el estrés oxidativo. Se reportan efectos anti inflamatorios, regeneración del tejido conectivo y estimulación de la producción de colágeno. (Calderón, 1992)

2.3 Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)



Figura 7. Planta de Mortiño

2.3.1 Descripción Botánica

Clasificación científica: los arándanos o mortiño pertenecen a la familia de las Ericáceas (Ericaceae).

Nombre científico: *Vaccinium floribundum* Kunth

Nombre común: Mortiño, Arándano, Uva del monte.

Para el Ecuador se citan tres especies, la mas conocida por sus frutos comestibles es *V. floribundum* que crecen en altitudes que van de 1000 a 4500 msnm. Es un arbusto con altura menor a 50 cm hojas pequeñas con bordes aserrados, la flor es rosada en forma de campana. El fruto es una baya esférica azul morado de 6mm de diámetro.

Su hábito de crecimiento produce una sola cosecha extendida entre octubre y diciembre de cada año. El consumo en el Ecuador es básicamente en fresco y algo procesado en mermeladas, se consume en fresco en la época

de Día de los Difuntos para preparar la tradicional colada morada. (Lojan, 1997)

2.3.2 Composición

| COMPOSICION POR 100 G FRUTA | |
|------------------------------------|------|
| Calorías (Kcal.) | 30.1 |
| Hidratos de Carbono (g) | 6.9 |
| Fibra (g) | 1.8 |
| Potasio (mg) | 88 |
| Magnesio (mg) | 0.5 |
| Pro vitamina A (mcg) | 12 |
| Vitamina C (mg) | 17 |
| Vitamina E (mg) | 5 |
| Agua (g) | 87.4 |
| Proteínas (g) | 0.3 |

Cuadro 3. Composición nutricional de Mortiño. Fuente: 1995 Blueberry Statistical Record, NABC (North American Blueberry Council)

2.3.3 Propiedades

Estas frutas son de bajo valor calórico por su escaso aporte de hidratos de carbono. En general, las bayas silvestres son buena fuente de fibra; que mejora el tránsito intestinal, y de potasio, hierro, calcio, y de diversos ácidos orgánicos. Sin embargo, lo que en realidad caracteriza a estas frutas es su abundancia de pigmentos naturales (antocianos y carotenoides) de acción antioxidante. En la alimentación humana, este tipo de frutas constituyen una de las fuentes más importantes de antocianos, que les confieren su color característico y que están junto con ácidos orgánicos tales como el ácido oxálico o el ácido málico, responsables también de su sabor. La vitamina C tiene acción antioxidante, al igual que los antocianos y carotenoides (Fundación Eroski, 2009).

2.4 Mortiño (*Solanum Nigrum*)



Figura 8. Planta de Mortiño

2.4.1 Descripción Botánica

Clasificación científica: El Mortiño pertenece a la familia de las Solanáceas

Nombre científico: *Solanum Nigrum*

Nombre común: Tomatillo del diablo, Hierba Mora, Mortiño

La Hierba Mora es una planta anual que se encuentra en los jardines y terrenos baldíos, a lo largo de tapias, en Norte y Sudamérica. Es una planta común, nativa de las regiones cultivadas de Sierra en el Ecuador. El tallo es angular, erguido ramificado y crece de 30-60 centímetros y puede ser glabro y cubierto con filamentos doblados hacia adentro. Las hojas son alternadas, verde oscuras, aovadas, denticuladas y casi enteras, Los racimos umbélicos y caídos con flores blancas o violeta pálida, junto con una baya morada o negra de el tamaño de una arveja. La baya es similar pero no idéntica a la baya comúnmente conocida como “Mortiño” en los mercados del Ecuador. (White, 1986)

2.4.2 Composición

| COMPOSICION POR 100 G DE FRUTA Y HOJAS | |
|---|--------|
| Calorías (Kcal.) | 355.04 |
| Carbohidratos (g) | 35.24 |
| Grasa (g) | 4.60 |
| Proteínas (g) | 17.66 |
| Calcio (mg) | 37.8 |
| Sodio (mg) | 18.4 |
| Potasio (mg) | 134.04 |
| Fibra (%) | 6.81 |

Cuadro 4. Composición nutricional de mortiño. Fuente: Akubugwo et al.: Nutritive Value of *S. nigrum* Seed and Leaves

2.4.3 Propiedades

Esta planta se reconoce por su efecto como narcótico y purgante, además se considera analgésico, aplicada por vía externa (por ejemplo, en cataplasmas)

El jugo de la hierba fresca es a veces utilizado para la fiebre y para aliviar el dolor. La infusión ha sido utilizada en pequeñas dosis para calmar los nervios.

Es altamente tóxica en crudo. Aunque pierde gran parte de su toxicidad al hervir, no debe utilizarse sino bajo el estricto control de un especialista. Las bayas negras son muy venenosas. Como es una mala hierba común en jardines y prados, conviene utilizar guantes para arrancarla. (White, 1986)

Conclusiones

Conocer las características generales y sobre todo los efectos beneficiosos atribuidos a éstas especies vegetales justifican el interés por conocer su composición química, a través del cual podemos conocer las sustancias responsables de sus diferentes propiedades y sus posibles usos dentro de la industria alimenticia.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

Introducción

En este capítulo se aborda la descripción de la metodología experimental utilizada en el desarrollo del presente trabajo de graduación. Los métodos de selección y preparación del material vegetal, obtención de extractos y desarrollo de sistemas cromatográficos para separar los compuestos fenólicos de interés son detallados. Además, se describe la metodología espectroscópica utilizada para identificar las características de los compuestos aislados.

3.1 Selección y preparación del material vegetal.

El material vegetal utilizado para el desarrollo experimental del presente estudio fue adquirido en dependencia de su disponibilidad. Se utilizaron dos ecotipos de maíz morado, diferenciables por la intensidad de coloración de sus granos. En Salcedo (Cotopaxi) se adquirió el ecotipo de maíz morado con mayor intensidad de color (Ecotipo 1) y el mortiño (*V. floribundum*).

El ataco y el maíz morado de menor intensidad de color (Ecotipo 2), fueron adquiridos en mercados locales de Cuenca. En esta localidad se adquirió *Solanum nigrum*, conocido en esta zona como “mortiño”.

El material vegetal, previa su utilización en la preparación de extractos, fue secado al ambiente durante 5 días. Una vez secos cada especie vegetal fue pulverizada en una licuadora industrial para obtener una distribución homogénea de sus componentes al momento de obtener los extractos. El

material preparado en estas condiciones fue utilizado para la obtención de extractos vegetales.



Zea mays Ecotipo 1



Zea mays Ecotipo 2



Solanum nigrum



Vaccinium floribundum



Amaranthus caudatus

Figura 9. Especies vegetales en estudio

3.2 Obtención de extractos

3.2.1 Método de Soxhlet para obtención de extracto de maíz morado

Consistió en la extracción de compuestos activos de los granos de maíz a través de reflujo con un solvente adecuado, en este caso Metanol, el cual posteriormente se eliminó en el rotavapor, para así obtener el extracto deseado. Éste debió ser mantenido en refrigeración y alejado de luz para conservar sus características químicas.

Materiales y Reactivos:

- Aparato de Soxhlet
- 1 probeta de 250ml
- Cartuchos de papel filtro de 10x10 cm
- Maíz seco y pulverizado.
- Metanol destilado.
- Rotavapor
- 2 frascos de vidrio
- 2 pipetas paster
- 2 peras de goma
- Ultrasonido
- Acetona

Procedimiento

- En cada cartucho de papel filtro se colocaron 30g de muestra.
- Insertamos dentro del cilindro del aparato de Soxhlet
- Se midieron 250 ml de Metanol destilado, se colocaron en los balones del aparato de Soxhlet, se encendió el equipo a 60°C y se abrió la toma de agua fría.
- El tiempo de reflujo fue de alrededor 4 horas.
- Luego se eliminó el solvente en el rotavapor

- Debido a que los extractos estaban muy densos se utilizaron 20 ml de Acetona junto con el ultrasonido para facilitar la transferencia hacia los frascos.
- Se colocaron los frascos por 24 horas en un lugar oscuro y a temperatura ambiente para evaporar el solvente por completo.
- Una vez que los extractos estuvieron libres de solvente se sellaron con parafina y se refrigeraron a 4°C



Figura 10. Rotavapor

3.2.2 Método de Macerado para la obtención de extractos de Ataco y Mortiño

Consiste en la extracción de compuestos activos de las muestras de ataco y mortiño a través de maceración con un solvente polar, en este caso Metanol durante una alrededor de una hora triturando constantemente. Posteriormente se filtra y se almacena el extracto en refrigeración.

Materiales y Reactivos:

- Mortero
- 1 probeta de 100ml
- Metanol destilado
- Ácido Clorhídrico
- Balón de aforo de 100ml
- 1 pipeta volumétrica de 1ml

- Papel filtro
- 1 embudo
- 1 soporte para embudo
- 1 vaso de precipitación de 100ml
- 1 frasco de vidrio

Procedimiento

- Se pesaron 25 gramos de muestra seca y pulverizada y se coloca en un mortero.
- Se colocaron 100ml de Metanol y se dejó macerar por una hora moviendo constantemente.
- Una vez transcurrido el tiempo se filtró la mezcla y se almacenó en extracto obtenido a 4°C

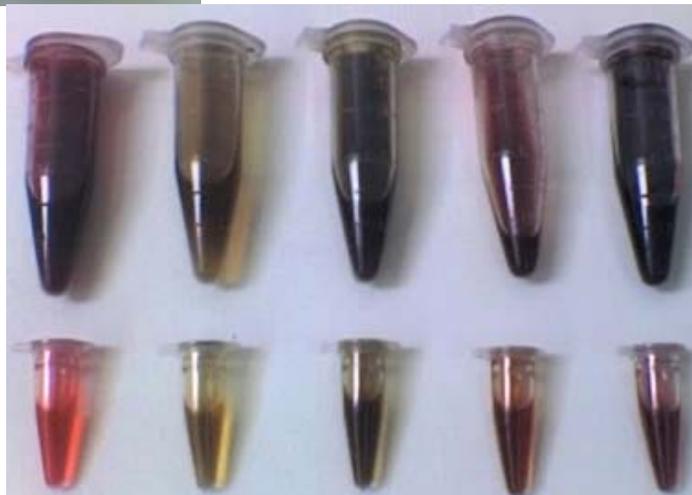


Figura 11: Preparación y obtención de extractos por maceración.

3.3 Identificación del perfil de Compuestos fenólicos por Cromatografía en Capa Fina Analítica

Consiste en la obtención del patrón cromatográfico de los extractos en estudio a través de cromatografía a fin de realizar una primera aproximación al tipo de compuestos presentes tomando en cuenta el valor del Factor de Retención (R_f) y la fluorescencia de la manchas en luz UV. Por este método se puede optimizar las fases móviles a utilizar en la cromatografía preparativa.

Materiales y reactivos

- Placas cromatográficas de silica gel de 5x5 cm.
- 1 micropipeta
- 1 cámara para cromatografía
- 100ml de una solución de Butanol-Ácido Acético-Agua (BAW) 4:1:5
- 100 ml de una solución de Metanol-Acetato de Etilo-Acido acético (75:24:1)
- 200 ml de Reactivo de Folin Ciocalteau
- Un atomizador plástico
- Cámara de luz UV

Procedimiento

- Se tomó la placa de silica gel de 5x5 cm. y con la ayuda de la micropipeta se sembró la muestra a 1cm del borde inferior de la placa
- Se repitió el proceso de siembra por 3 ocasiones en cada muestra para depositar una cantidad adecuada para la separación cromatográfica.
- Se dejó secar por 5 minutos la placa con la muestra.
- Se introdujo la placa en la cámara cromatográfica que contiene el sistema de solvente adecuado de acuerdo al tipo de extracto.

- Se dejó correr la cromatografía hasta que el solvente ascienda hasta 2cm antes del borde superior.
- Se marcó el frente de solvente para calcular el valor de Rf
- Se dejó secar la placa.
- Con la ayuda de un atomizador se roció la placa con el reactivo de Folin
- Se calentó la placa con la ayuda de una placa calefactora.
- Se marcaron las manchas y finalmente se introdujeron al interior de la cámara UV para marcar las zonas fluorescentes.

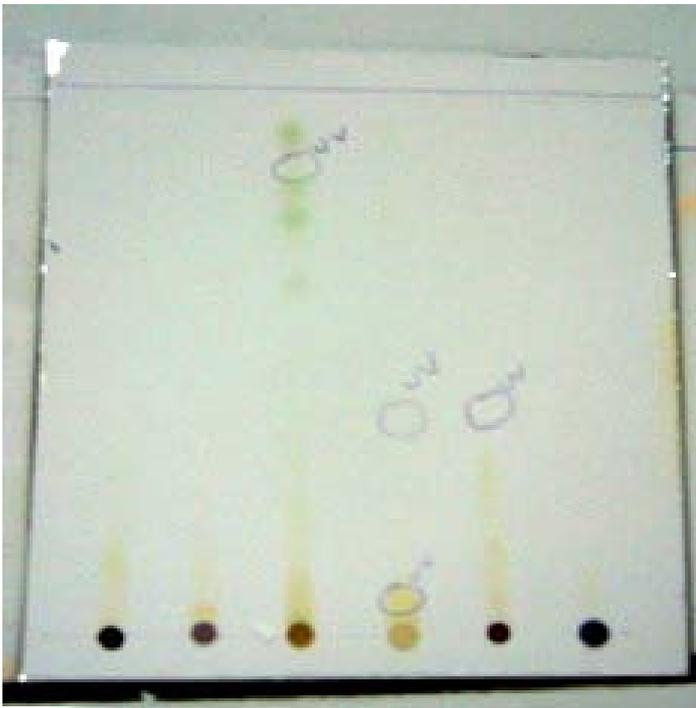


Figura 12 . Placa Cromatográfica

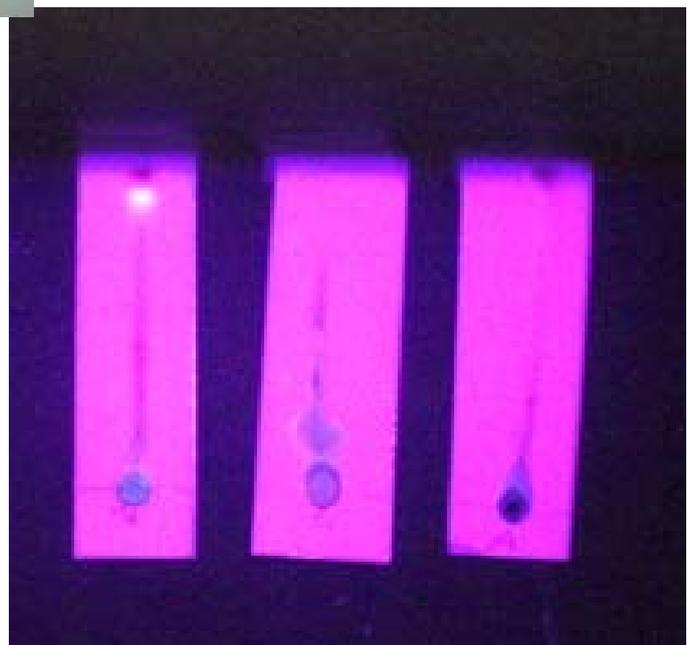


Figura 13. Placas cromatográficas vistas bajo luz UV

3.4 Separación de Compuestos fenólicos por Cromatografía en Capa Fina preparativa.

Con el fin de obtener los componentes identificados en la cromatografía analítica, se prepararon placas cromatográficas y se aplicaron los extractos vegetales. La separación de los componentes se desarrolló según el siguiente protocolo:

Materiales y reactivos

- Placas de vidrio de 20x20 cm
- Silica gel
- Estufa
- 1 pipeta paster
- Cámara cromatográfica
- Espátula
- 1 vaso de precipitación de 100ml
- Acetato de Etilo
- Butanol
- Baño de Ultrasonido
- 1 embudo
- 1 erlenmeyer de 125ml
- 1 soporte para embudo
- Papel filtro
- Balones de fondo redondo (50 mL, cuello 14.5)
- Rotavapor

Procedimiento

- Se prepararon placas de silica gel de 20x20cm y se activaron en la estufa a 110°C por 24 horas
- Se sembró la muestra con la ayuda de una pipeta paster y algodón.
- Se corrió la placa utilizando la mezcla ideal de solventes.
- Al finalizar la corrida del solvente se dejó secar por completo la placa.

- Con la ayuda de una espátula cada mancha se raspó y se colocó el polvo en un erlenmeyer de 125ml y se adicionó un solvente adecuado.
- Se sumergió el erlenmeyer en el ultrasonido para ayudar a la mezcla adecuada de la silica y el solvente.
- Se filtro cada fracción y se colocaron en balones de fondo redondo.
- Se evaporó el solvente de cada fracción obtenida en el rotavapor.

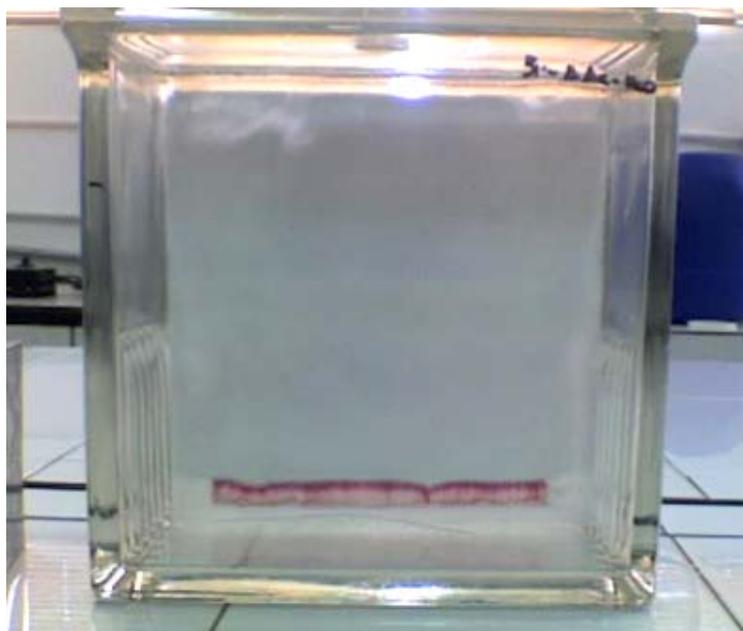


Figura 14. Cromatografía preparativa en placas de vidrio

3.5 Determinación de las propiedades espectroscópicas en espectroscopia UV

Este trabajo se realizó con el fin de obtener los espectros de cada una de las fracciones obtenidas y así aproximarse al perfil de compuesto fenólico específico tomando en cuenta su λ máximo y sus características espectrales en general.

Materiales y reactivos

- Tubos eppendorf
- 1 piseta
- 1 vaso de precipitación de 250ml
- 2 celdas de cuarzo
- Espectrofotómetro UV-VIS GENESIS Serie 10
- Metanol

Procedimiento

- Las fracciones obtenidas se disolvieron en metanol previa la lectura en el espectrofotómetro y se colocaron en tubos eppendorf anteriormente rotulados.
- Se hizo la lectura del blanco en una celda de cuarzo utilizando metanol destilado.
- Se colocó en otra celda la muestra y se realizó un barrido de exploración de cada una de las fracciones en un rango entre 200 a 600nm
- Se obtuvo el espectro y los datos se almacenaron para su posterior análisis.

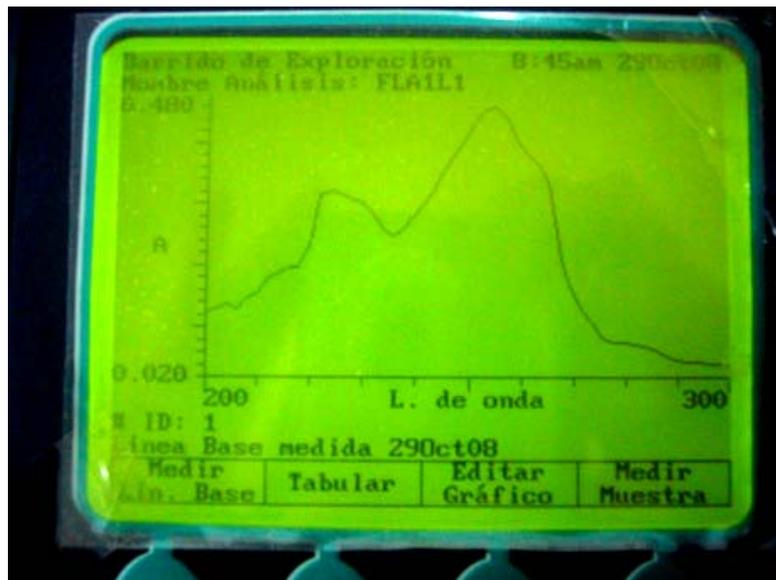


Figura 15. Espectro UV de Ataco (*Amaranthus caudatus*)

3.6 Desplazamientos batocrómicos e hipsocrómicos

Con el objeto de aproximarse a la identificación de los compuesto fenólicos presentes en cada una de las fracciones, una vez obtenidos sus espectros se utilizaron reactivos de desplazamiento químicos para determinar los posibles desplazamientos de los máximos espectrales hacia regiones bato e hipsocrómicas.

Materiales

- Tubos eppendorf
- 1 piseta
- 1 vaso de precipitación de 250ml
- 2 celdas de cuarzo
- Metanol destilado y desecado

Reactivos de desplazamiento

- Cloruro de Aluminio al 5%
- Hidróxido de Sodio 2M
- Metóxido de Sodio
- Acetato de Sodio
- Ácido Bórico

Equipo

- Espectrofotómetro UV-VIS GENESIS Serie 10

Procedimiento

- Se prepararon los reactivos de desplazamiento en las concentraciones citadas.
- Se realizó la lectura del blanco en el espectrofotómetro con metanol
- Se colocó la muestra de cada fracción obtenida en la celda de cuarzo y a continuación se añadió el reactivo de desplazamiento respectivo en las cantidades adecuadas.
-

- Se realizó la lectura y se comparó estos datos con los espectros de las fracciones sin reactivos químicos.

3.7 Determinación de antocianos en maíz morado y mortiño (*V. floribundum*) por espectroscopía UV-VIS

Considerando que los espectros de las antocianinas cambian con el pH del medio en el que se encuentren, los extractos vegetales fueron ajustados a pH 1 que es el valor en el cual las antocianinas presentan más estabilidad. Para éste efecto las muestras fueron extraídas en una solución de Metanol HCl al 1% y sus espectros fueron obtenidos en un rango de 500 a 600nm. Como reactivo de desplazamiento químico se utilizó Cloruro de Aluminio al 5% en metanol, dado que los espectros de antocianinas desplazan de manera característica en presencia de éste

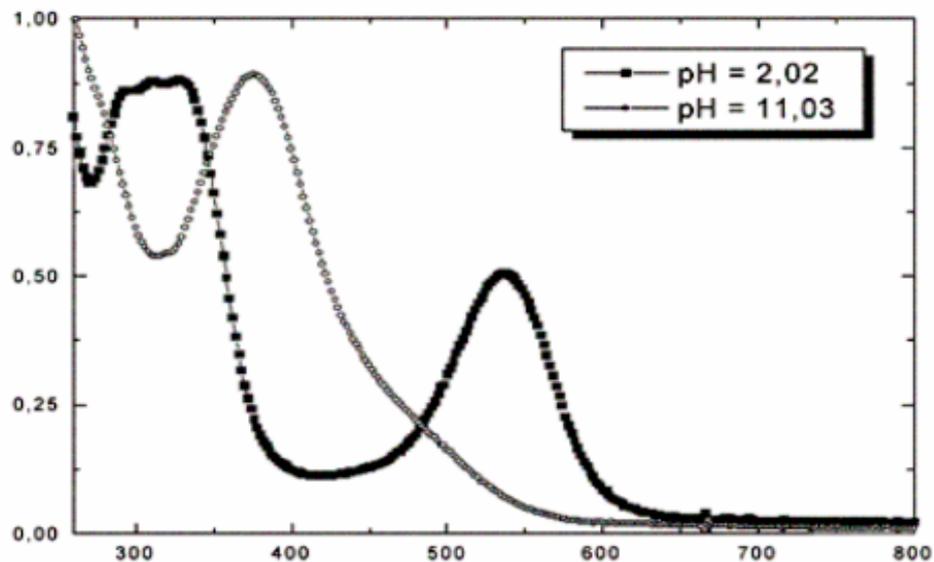


Figura 16. Formas de los espectros UV-VIS de las antocianinas en general

Materiales y Reactivos

- Metanol-HCl al 1%
- Ácido Clorhídrico concentrado
- Cápsulas de porcelana
- 1 balón de aforo de 100 ml
- Papel filtro
- 1 embudo de vidrio
- 1 soporte para embudo
- Tubos de ensayo con tapa.....
- Celdas de cuarzo
- 1 piseta
- Cloruro de Aluminio al 5%
- 1 vaso de precipitación

Reactivo de desplazamiento

- Cloruro de Aluminio al 5% en Metanol

Equipo:

- Espectrofotómetro UV-VIS GENESIS Serie 10
- 1 balanza analítica.
- Potenciómetro

Procedimiento.

- Se pesaron 30 gramos de cada muestra previamente seca y pulverizada y se colocaron en un mortero.
- Se adicionaron 50 ml de Metanol-HCl al 1%
- Se agitó la muestra con el fin de extraer sus componentes activos
- Los extractos se colocaron en tubos de ensayo con tapa, previa filtración.
- Cada muestra fue diluida en metanol para hacer la lectura en el espectrofotómetro.

- El pH de cada extracto fue ajustado a 1 con HCl concentrado
- En una celda de cuarzo se realizó la lectura del blanco con Metanol destilado
- Se colocó la muestra en otra celda y se realizó la lectura en un rango de 500 a 600nm
- Se obtuvo el espectro y los máximos de absorción fueron registrados y almacenados en una plantilla Excel.



Figura 17. Extracto de Maíz Morado y Mortiño a pH 1

3.8 Análisis estadístico de datos

Los datos obtenidos a partir de las mediciones de los desplazamientos químicos de los máximos de absorción de las fracciones fueron analizadas estadísticamente con el fin de establecer patrones que los aproximen a la estructura del compuesto fenólico con desplazamientos similares. Para el efecto se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA).

Se construyó una matriz de datos, asignando a cada desplazamiento valores de 0 y 1 (0 corresponde a no similaridad, 1 corresponde a similaridad). Esta base de datos se comparó con una construida a partir de los mismos criterios, en base a datos bibliográficos de los desplazamientos y la altura máxima de las bandas de compuestos fenólicos base. Se construyeron dendogramas en base a esta información utilizando el software SCAN 6.0. Estos gráficos fueron interpretados y se logró identificar el grupo de compuestos característicos de las fracciones aisladas en función a su similaridad con los desplazamientos estándar de las familias de fenólicos en estudio.

Conclusiones

La metodología utilizada para la obtención de extractos permitió evidenciar la presencia de compuestos fenólicos en las especies vegetales estudiadas. Fue necesario hacer varias consideraciones al momento de ejecutar la extracción, principalmente la polaridad de los solventes y la mezcla ideal de los mismos para la corrida cromatográfica, así como también se tuvo que ajustar el pH para visualizar los máximos de absorción de las antocianinas. El trabajo permitió estandarizar la técnica para identificar compuestos fenólicos en matrices vegetales

CAPÍTULO 4 RESULTADOS

4.1 Análisis de Factores de Retención (Rf) en cromatografías analíticas de extractos.

Los perfiles cromatográficos obtenidos permitieron establecer valores de Rf para las manchas características de los extractos desarrollados en diferentes sistemas de solventes.

| Extracto | Rf (según sistema de solvente) | | | | |
|----------------------------------|--------------------------------|-----|----------------|----------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Maíz | 8.9 | --- | 72 | 67 | 93 |
| Ecotipo 1 | 15 22 | --- | 84 | 91 | |
| Maíz | 16 | --- | 19 | 56 | --- |
| Ecotipo 2 | 83 | --- | | | --- |
| Ataco | 8.9 6.3 | 84 | 64 71 74 | 69 | 73 |
| Mortiño | 8.9 | 6.3 | 57 | 47 | 23 |
| <i>Solanum nigrum</i> | 63 | 38 | 71 74 | 56 80 | |
| Mortiño | 63 | 38 | 64 74 | 69 82 | 23 |
| <i>Vaccinium Floribundum</i> | | | | | |

Cuadro 5: Datos de Rf de manchas aisladas a través de cromatografía en capa fina. Solvente 1: Acido acético-Cloroformo (1:9). Solvente 2: Acetato de etilo-Benzeno (9:11). Solvente 3: Butanol-Acido acético-Agua (4:1:5). Solvente 4: Metanol-acetato de etilo-Acido acético (75:24:1) Solvente 5: Butanol-Etanol-Agua (4:1:2.2)

4.2 Comparación de patrones espectroscópicos de los fenólicos aislados con datos bibliográficos

Las fracciones aisladas por la metodología descrita en 3.4 fueron estudiadas mediante su patrón espectroscópico con reactivos de desplazamiento. Los resultados obtenidos que se reportan a continuación se refieren a los máximos del espectro de absorción UV para la solución metanólica de las fracciones aisladas, y los desplazamientos (Δ) obtenidos, tomado como base la lectura en metanol del máximo principal.

En el Cuadro 5 se reporta el patrón espectroscópico UV para las fracciones que presentaron fluorescencia luego del desarrollo cromatográfico y su revelado mediante luz UV ($\lambda = 315 \text{ nm}$).

| Especie | Fracción | Máximos (nm) | | Desplazamientos químicos (Δ nm) | | | | |
|------------------------------|----------|--------------|-------------|---|-------------------|-------|--------------------------------|-------|
| | | Principal | Subsidiario | NaOH | AlCl ₃ | NaOAc | H ₃ BO ₃ | NaOMe |
| <i>Solanum nigrum</i> | 1 | 224 | 264 | 15 | 2 | 0 | 0 | -2 |
| | 2 | 228 | 280 | 10 | -2 | -2 | 0 | -6 |
| <i>Vaccinium floribundum</i> | 1 | 224 | 254 | 12 | 6 | 8 | 0 | 2 |
| <i>Zea Mays Ecotipo 1</i> | 1 | 224 | 258 | -6 | 2 | 5 | 0 | ND |
| | 2 | 226 | 258 | 10 | -2 | -4 | 0 | ND |
| <i>Zea Mays Ecotipo 2</i> | 1 | 224 | 256 | 4 | 2 | 5 | 0 | 0 |
| <i>Amaranthus Caudatus</i> | 1 | 224 | 260 | 4 | 28 | 2 | 2 | 2 |
| | 2 | 224 | 260 | -14 | 2 | 0 | 2 | 0 |

Cuadro 6: Datos de máximos detectados por Espectroscopía UV y desplazamientos químicos para las fracciones fluorescentes aisladas de las especies en estudio. NaOH: Hidróxido de Sodio, AlCl₃: Cloruro de Aluminio, NaOAc: Acetato de Sodio, H₃BO₃: Acido Bórico, NaOMe: Metóxido de Sodio. ND: no detectable.

En el desarrollo de las cromatografías se aislaron fracciones que presentaron coloración en gamas violetas en la especie *Amaranthus caudatus*. En este caso se realizó un trabajo similar al reportado en el cuadro

anterior. A continuación se reporta el comportamiento espectroscópico de estas fracciones en metanol y los desplazamientos obtenidos utilizando los reactivos descritos en la Sección 3.6 Metodología.

| Especie | Fracción | Máximos (nm) | | Desplazamientos químicos (Δ) nm | | | | |
|----------------------------|----------|--------------|-------------|--|-------------------|-------|--------------------------------|-------|
| | | Principal | Subsidiario | NaOH | AlCl ₃ | NaOAc | H ₃ BO ₃ | NaOMe |
| <i>Amaranthus Caudatus</i> | 1 | 228 | 278 | ND | 4 | ND | 0 | 28 |
| | 2 | 230 | 280 | ND | 2 | 5 | -2 | 38 |

Cuadro 7: Datos de máximos detectados por Espectroscopía UV y desplazamientos químicos para las fracciones violetas aisladas de *A. caudatus*. NaOH: Hidróxido de Sodio, AlCl₃: Cloruro de Aluminio, NaOAc: Acetato de Sodio, H₃BO₃: Acido Bórico, NaOMe: Metóxido de Sodio. ND: no detectable.

4.3 Análisis de Componentes principales para las fracciones aisladas de las especies en estudio.

Para el desarrollo del Análisis de Componentes Principales se construyó una matriz de datos en base a la comparación del patrón de desplazamientos químicos de las fracciones fluorescentes y en la gama de violeta (para *Amaranthus caudatus*) analizadas con los datos espectroscópicos disponibles en bibliografía. La matriz de comparación de las familias de compuestos fenólicos utilizada para la elaboración de esta matriz se reporta a continuación.

| Tipo de Compuesto | Máximos nm | Desplazamientos químicos (Δ) nm | | | | |
|-------------------|-----------------|--|-------|-------------------|-------|--------------------------------|
| | λ_{max} | NaOH | NaOAc | AlCl ₃ | NaOMe | H ₃ BO ₃ |
| Flavonas | 315-350 | 40-60 | 0 | 25-40 | 45-65 | 12-36 |
| Flavonoles | 350-385 | 40-60 | 0 | 40-60 | 45-65 | 12-36 |
| Flavanonas | 275-295 | 30-40 | 30-40 | 20-30 | 0 | 10-15 |
| Isoflavonas | 245-270 | 10-15 | 5-15 | 10-20 | 0 | 10-15 |
| Chaconas | 370-395 | 40-60 | 0 | 50-65 | 0 | 12-36 |
| Auronas | 385-415 | 40-60 | 0 | 50-65 | 0 | 12-36 |
| Antocianinas | 475-545 | ND | ND | 15-50 | 0 | 0 |

Cuadro 8: Datos espectroscópicos UV y de desplazamientos químicos característicos para las familias de compuestos fenólicos más comunes. ND: no detectable.

Las bases de datos construidas se reportan en los anexos 1-4. Mediante el procesamiento de datos en el programa SCAN 6.0, se elaboraron dendogramas con el fin de establecer patrones de similitud entre los resultados obtenidos con las fracciones aisladas y los datos bibliográficos.

La similitud entre los objetos de la matriz se establece del análisis de los gráficos. Los grupos formados por las terminales de los dendogramas presentan a los objetos con mayor similitud. De este modo es posible relacionar los datos experimentales con los de referencia y poder aproximar la estructura de los compuestos fenólicos aislados con los compuestos conocidos, cuyos desplazamientos químicos fueron obtenidos de fuentes bibliográficas.

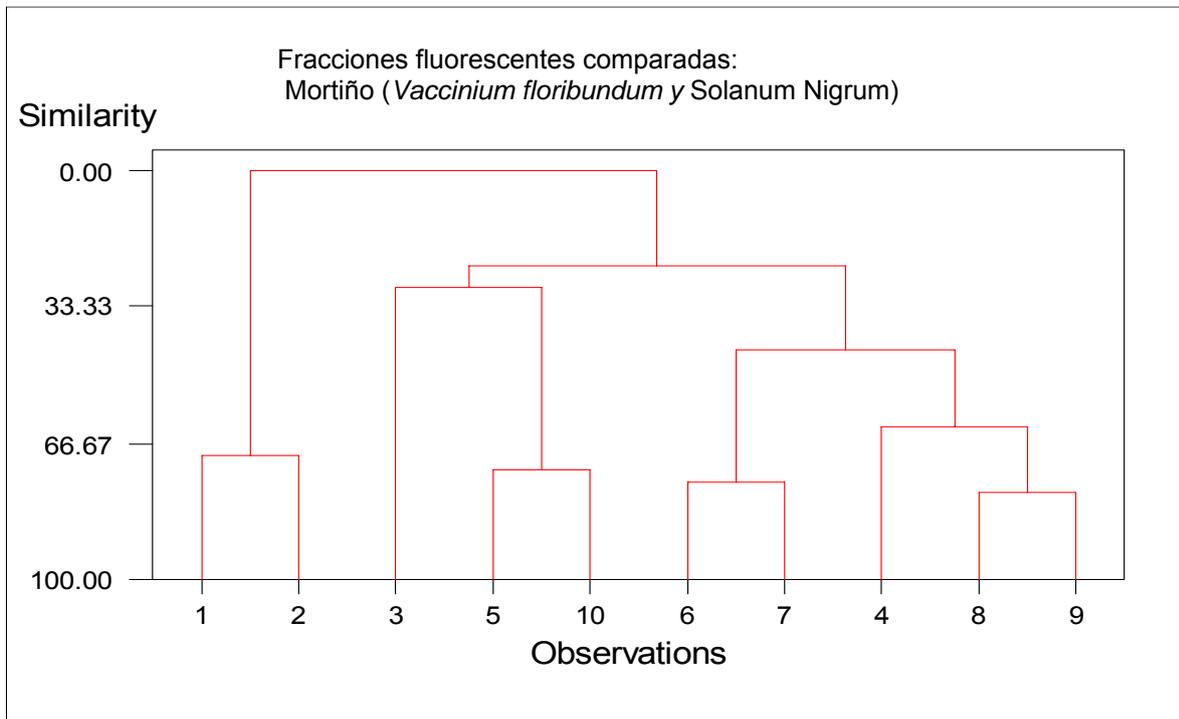


Figura 18: Dendograma de comparación de desplazamientos químicos de fracciones de Mortiño con datos espectroscópicos de compuestos fenólicos. Datos espectroscópicos: 1 -7. Fracciones evaluadas: 8-9 *Solanum Nigrum* fracciones 1 y 2. 10 *Vaccinium Floribundum*.

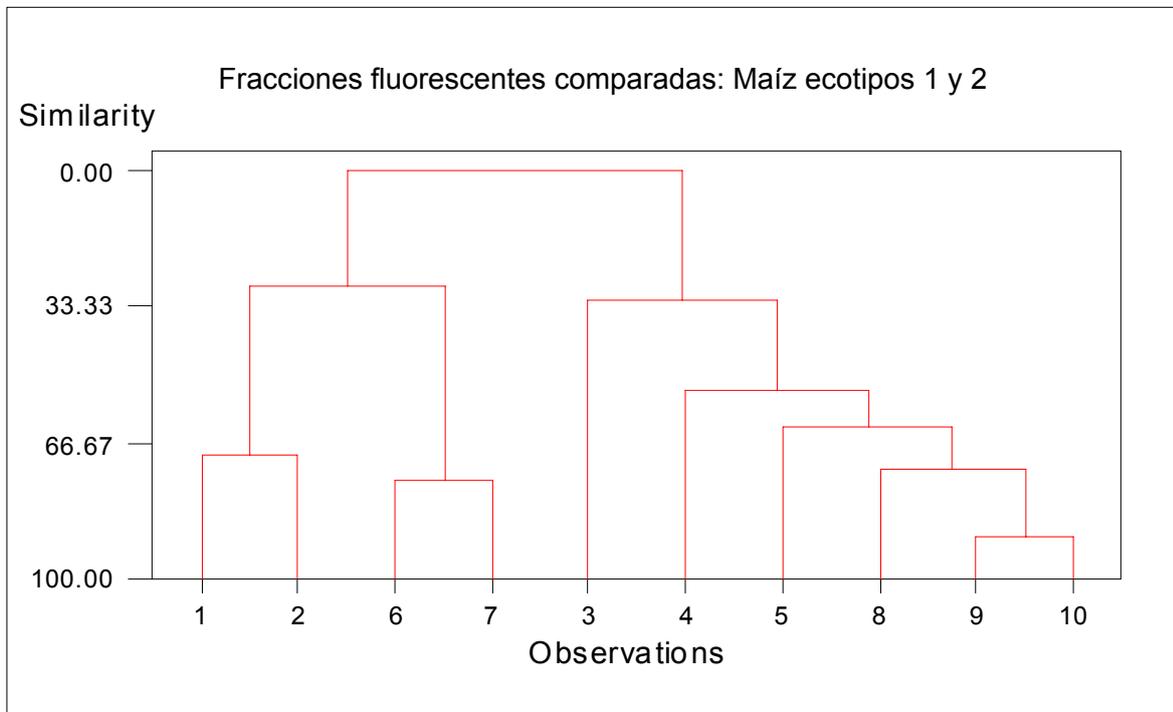


Figura 19: Dendograma de comparación de desplazamientos químicos de fracciones de Maíz Morado con datos espectroscópicos de compuestos fenólicos. Datos espectroscópicos 1-7. Fracciones evaluadas 8 *Zea Mayz* ecotipo 2. 9-10 *Zea Mayz* ecotipo 1 fracciones 1 y 2

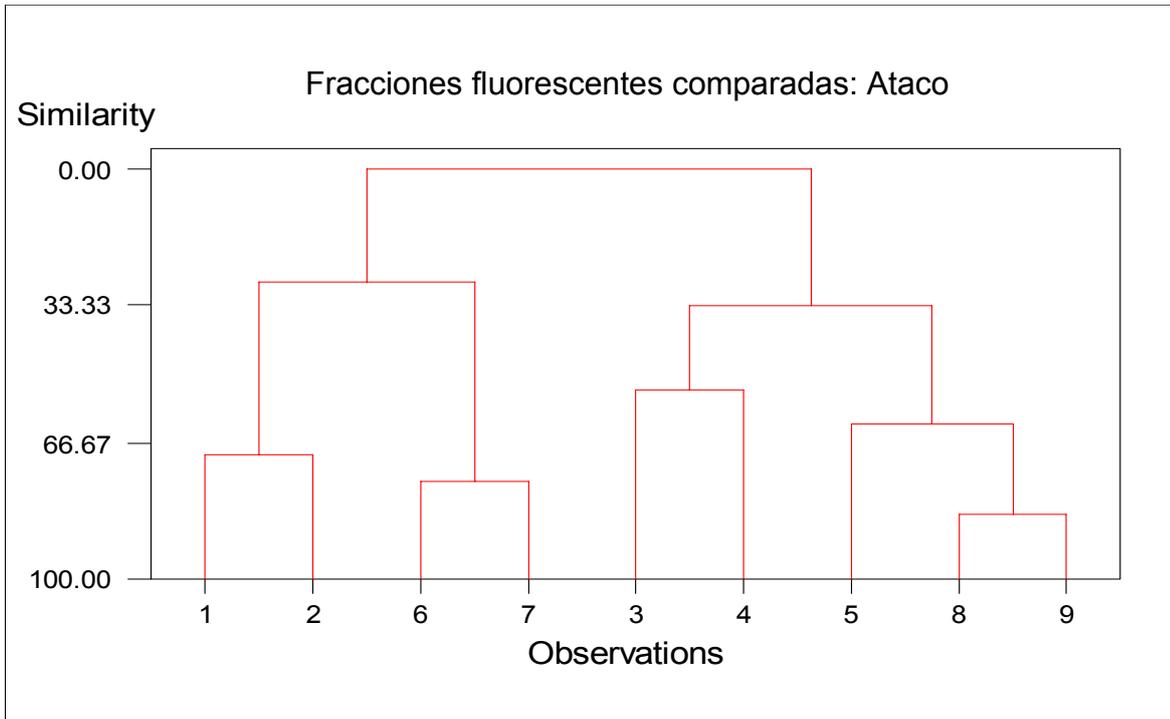


Figura 20: Dendograma de comparación de desplazamientos químicos de fracciones de Ataco con datos espectroscópicos de compuestos fenólicos. Datos espectroscópicos: 1-7. 8 Ataco fracción 1. 9 Ataco fracción 2.

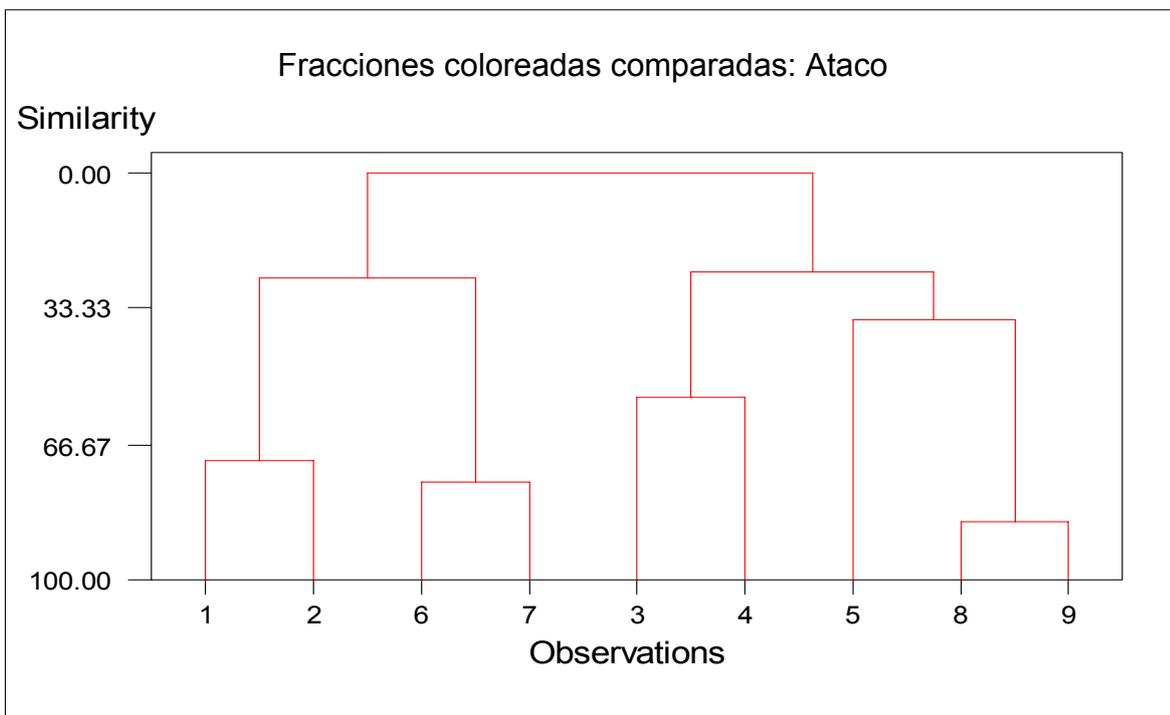


Figura 21: Dendograma de comparación de desplazamientos químicos de fracciones coloreadas de Ataco con datos espectroscópicos de compuestos fenólicos. Datos espectroscópicos: 1-7. 8 Ataco fracción 1. 9 Ataco fracción 2.

4.4 Análisis de Antocianinas en extractos totales de Zea Mays y Vaccinium Floribundum

Los extractos obtenidos por maceración a pH controlado como se describe en 3.7 fueron estudiados mediante su patrón espectroscópico con Cloruro de Aluminio. Esta estrategia se asumió debido a que los máximos de absorción de las antocianinas desplazan de manera característica en presencia de éste reactivo. Los resultados obtenidos que se reportan a continuación se refieren a los máximos del espectro de absorción UV para la solución metanólica de los extractos obtenidos, y los desplazamientos (Δ) con Cloruro de Aluminio obtenidos, tomado como base la lectura en metanol del máximo principal.

En el Cuadro 9 se reporta el patrón espectroscópico UV para los extractos de las especies Zea Mays ecotipos 1 y 2 y Vaccinium Floribundum

| Especie | Máximos (nm) | | Desplazamientos químicos (Δ) |
|------------------------------|--------------|-------------|---------------------------------------|
| | Principal | Subsidiario | $AlCl_3$ |
| <i>Zea Mays Ecotipo 1</i> | 534 | 228 | 16 |
| <i>Zea Mayz Ecotipo 2</i> | 534 | 228 | 16 |
| <i>Vaccinium Floribundum</i> | 534 | 232 | 18 |

Cuadro 9: Datos de máximos detectados por Espectroscopía UV y desplazamientos químicos para los extractos totales obtenidos de las especies en estudio. $AlCl_3$: Cloruro de Aluminio,

4.5 Identificación de antocianidinas para las fracciones aisladas de Zea mays ecotipos 1 y 2 y Vaccinium floribundum

Para el desarrollo del Análisis de Antocianinas se construyó una matriz de datos en base a la comparación del patrón de desplazamientos químicos en presencia de Cloruro de aluminio de las antocianidinas analizadas con los datos espectroscópicos disponibles en bibliografía.

La matriz de comparación de las antocianidinas se reporta a continuación.

| CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES DE LAS ANTOCIANINAS | | |
|---|------------------------------|---|
| Esqueleto | Metanol-HCl λ_{\max} | AlCl ₃ ($\Delta\lambda$ nm) |
| Hirsutidina | 536 | 0 |
| Malvidina | 542 | 0 |
| Petunidina | 543 | 24 |
| Delfinidina | 546 | 23 |
| Rosinidina | 524 | 0 |
| Peonidina | 532 | 0 |
| Cianidina | 535 | 18 |
| Pelargonidina | 520 | 0 |
| Luteolinidina | 493 | 52 |
| Apigenidina | 476 | 0 |

Cuadro 10: Datos espectroscópicos UV y de desplazamientos químicos característicos para las Antocianinas más comunes. ND: no detectable Fuente: Harborne 1957

A continuación se presentan los espectros de absorción de los extractos que contienen antocianinas. En el gráfico se comparan los espectros obtenidos sin adición de HCl y con el ajuste a pH 1, donde se evidencia el máximo de absorción característico de antocianinas.

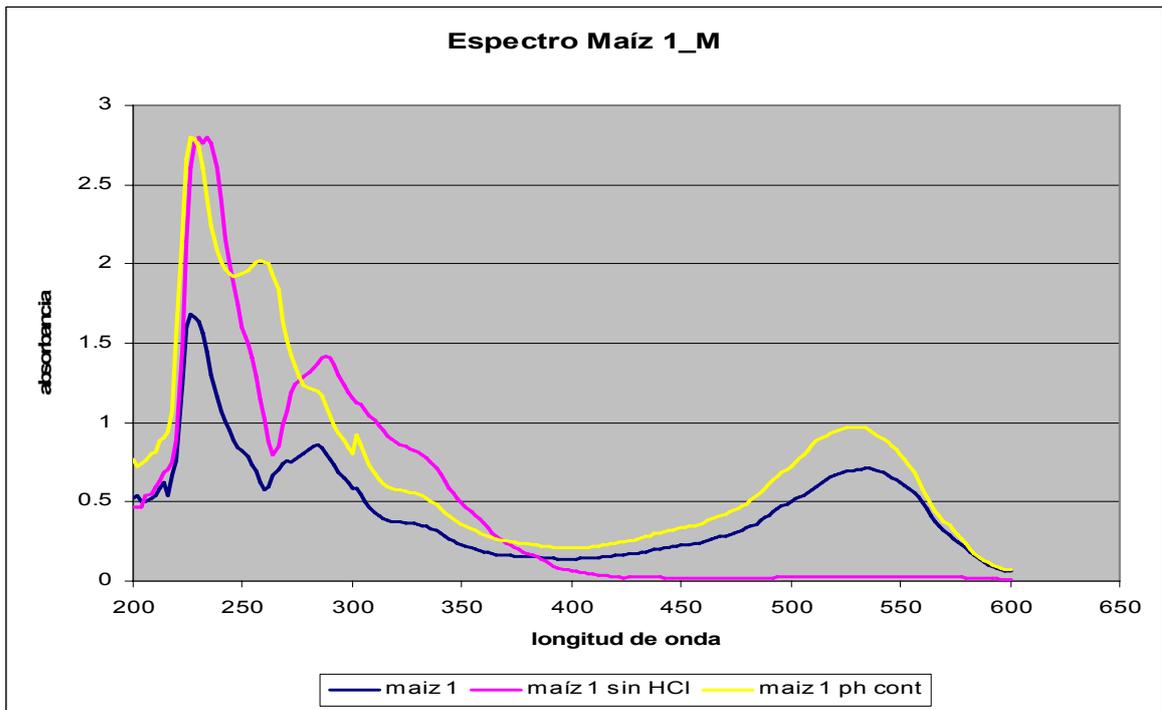


Figura 21: Espectro de absorción UV de antocianinas identificadas en *Zea Mays*, ecotipo 1

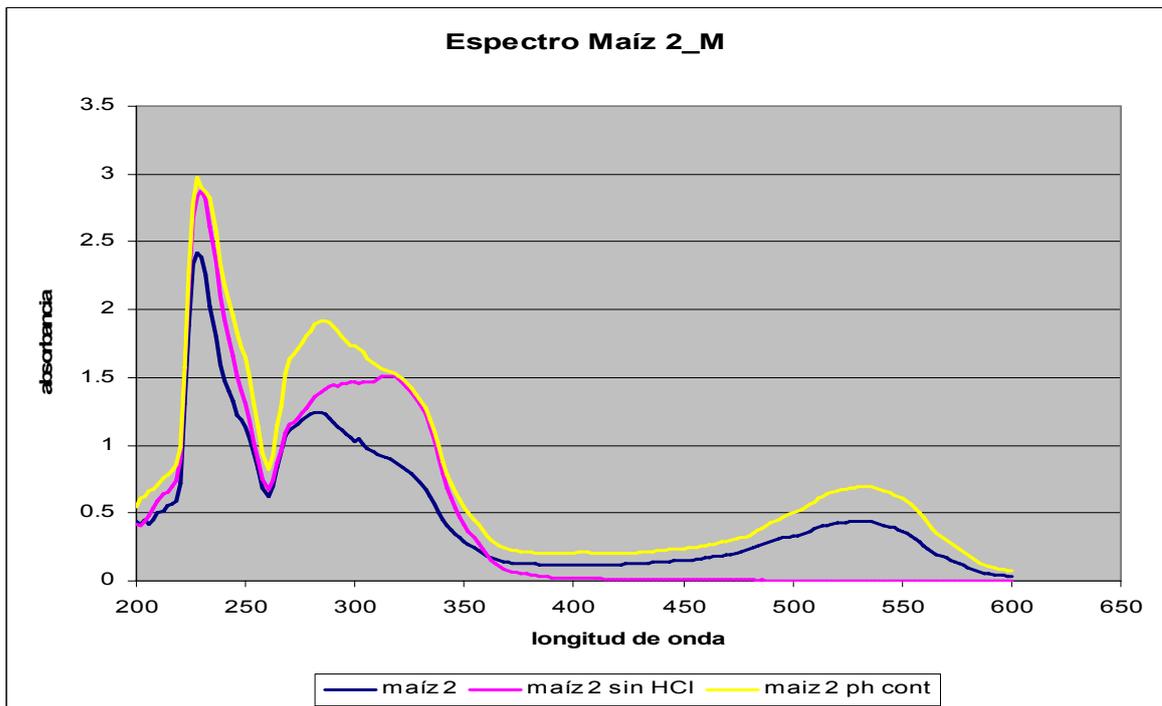


Figura 22: Espectro de absorción UV de antocianinas identificadas en *Zea Mays*, ecotipo 2.

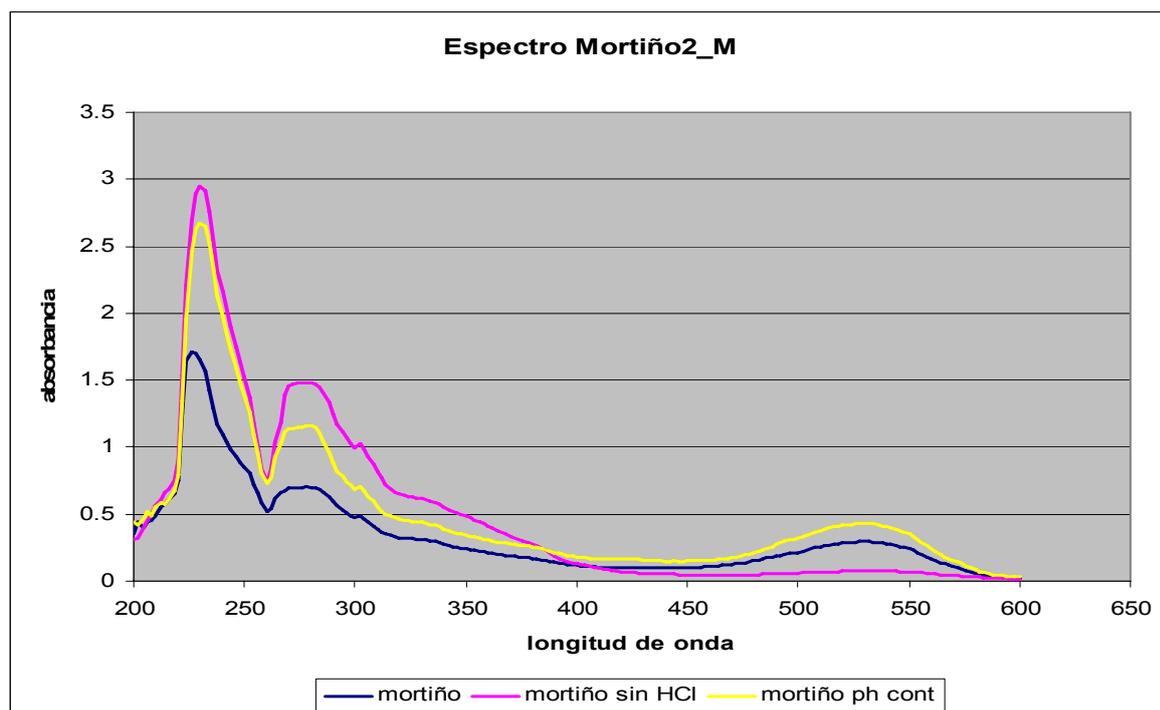


Figura 23: Espectro de absorción UV de antocianinas identificadas en *Vaccinium floribundum*.

CAPITULO 5

DISCUSIÓN

5.1 Análisis de R_f de los perfiles cromatográficos de las fracciones obtenidas de los extractos en estudio.

El estudio de los factores de retención de los extractos obtenidos para este trabajo permitió establecer el sistema de solventes adecuado para realizar las cromatografías preparativas y la separación en fracciones de las mezclas. Los extractos de maíz ecotipo 1 y 2 presentaron la mejor resolución en el sistema Acido acético-Cloroformo (1:9) (Ver cuadro 5).

El extracto de Ataco presenta una mejor separación en Butanol-Acido acético-Agua (4:1:5). Los extractos de Mortiño V. Floribundum y S. Nigrum presentaron mejor separación en los sistemas Butanol-Acido acético-Agua (4:1:5) y Butanol-Etanol-Agua (4:1:2.2).

El sistema de solventes BAW se reporta en varios trabajos similares como la mezcla de solventes ideal para la separación de compuestos fenólicos. El protocolo de extracción e identificación de flavonoides por TLC sugiere la utilización BAW (Butanol-Acido Acético-Agua) como solvente recomendado en proporción 4:1:5, dado que presenta una mejor separación de fracciones (Harborne, 1998).

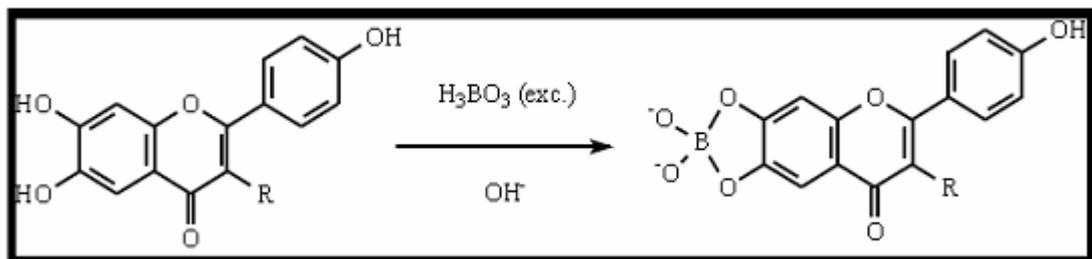
5.2 Comportamiento de los reactivos de desplazamiento en moléculas orgánicas.

Los reactivos de desplazamiento químico se utilizan ampliamente como una estrategia preliminar para la identificación de compuestos químicos. Se presentan reacciones químicas específicas entre los reactivos de desplazamiento y moléculas con un elevado grado de conjugación; es decir,

dobles enlaces alternados. Las reacciones también se evidencian en los grupos hidroxilo, característicos de los compuestos fenólicos.

5.2.1 Reacción de desplazamiento con Acido Bórico

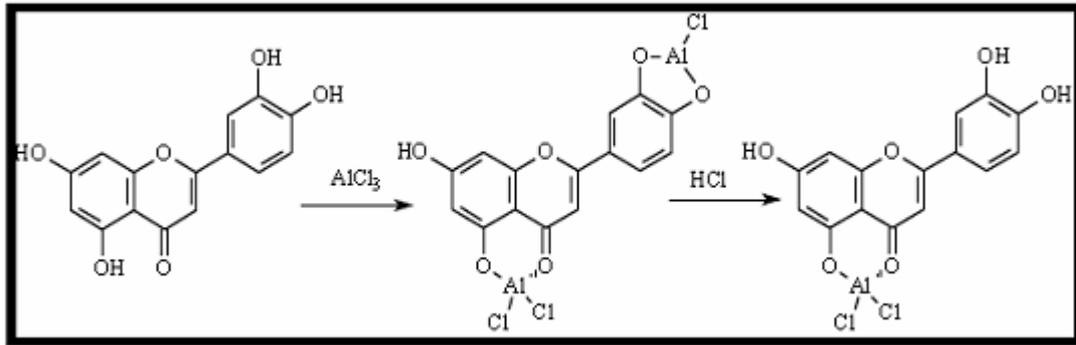
El H_3BO_3 en medio alcalino forma quelatos con hidroxilos fenólicos en posición relativa orto. La formación del quelato produce desplazamiento batocrómico. Las isoflavonas, flavanonas y flavonoles orto-dihidroxiadas muestran desplazamiento batocrómico de 10-15nm.



5.2.2 Reacción de desplazamiento con Cloruro de Aluminio

El AlCl_3 anhidro también forma quelatos con flavonoides orto-dihidroxiados, 3-hidroxiados y 5-hidroxiados. Por lo anterior, si al determinar el espectro con AlCl_3 se mantiene un desplazamiento batocrómico de 0-30nm se trata de una isoflavona o un flavonol 5-hidroxiado. (Markham, 1982)

Además los colores y por tanto las formas espectrales de las antocianinas cambian en presencia de los iones de hierro y Aluminio ya que pueden formar complejos con los sustituyentes hidroxilo de las antocianinas. El acomplejamiento en la posición 3 tiene un efecto batocrómico dado que los metales pueden generar un flujo de electrones sobre las antocianinas. (Saito y Harborne, 1983)



5.3 Comportamiento de las fracciones de extractos estudiados con reactivos de desplazamiento.

Con el fin de evaluar las características de los grupos cromóforos de los compuestos fenólicos aislados en las fracciones mediante desplazamientos batocrómicos e hipsocrómicos, se desarrolló el estudio del comportamiento de los máximos UV de las fracciones puras y con reactivos de desplazamiento.

Las fracciones estudiadas fueron aquellas que presentaron fluorescencia al ser irradiadas con luz UV, luego de la separación cromatográfica. El comportamiento de estas fracciones se debe a la presencia de fenólicos (Harborne, 1998). Los máximos de las fracciones y su comportamiento con reactivos de desplazamiento es reportado en el cuadro 6 (ver Resultados). Con los datos obtenidos se estableció una base de datos para realizar la comparación con datos bibliográficos y aproximarse al tipo de compuestos fenólicos aislados.

En la especie *A. caudatus* se aislaron fracciones coloreadas, las cuales fueron estudiadas con el fin de investigar la presencia de antocianinas. El resultado de este estudio no fue concluyente, por lo que los datos obtenidos no evidencian la presencia de antocianinas, según los desplazamientos químicos obtenidos.

5.4 Estudio de antocianinas en extractos totales de las especies en estudio.

Los pigmentos de antocianina sufren cambios estructurales reversibles con los cambios de pH manifestados por el cambio de su espectro de absorción. Giusti y Ronald presentan en su trabajo de investigación, un protocolo de extracción de antocianinas a pH diferencial, previa maceración de la muestra a temperatura ambiente con Metanol-HCl al 0.1% y posterior filtrado con papel filtro Wathman N.1. La transformación estructural del cromóforo de antocianinas extraídas bajo éstas condiciones se analiza mediante espectroscopía UV visible (Giusti y Ronald, 2001)

5.5 Identificación de compuestos fenólicos en las fracciones obtenidas de los extractos por Análisis de Componentes Principales

El Análisis de Componentes Principales (PCA) forma parte de las estrategias de Análisis Multivariante de Datos. El objetivo de estas técnicas es desarrollar una exploración de un grupo de objetos, descritos mediante un cierto número de variables, buscando la relación entre objetos y variables (Forina *et al*, 1993).

En el caso de estudio desarrollado, los objetos fueron las diferentes fracciones obtenidas de los extractos, y las variables, los desplazamientos de los máximos UV, obtenidas por reactivos de desplazamiento químico.

La construcción de la matriz de objetos incluyó desplazamientos químicos característicos de compuestos fenólicos conocidos, con el fin de establecer la similaridad de los objetos en estudio con los de referencia.

En general una medida de similaridad entre dos objetos S y t tiene las siguientes propiedades

$$0 \leq S_{st} \leq 1$$

$$S_{ss} = 1$$

$$S_{st} = S_{ts}$$

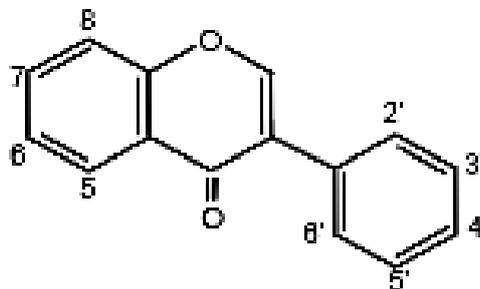
Una de las distancias más utilizada en quimiometría es la distancia euclidiana, la cual se calcula con la siguiente expresión. (Todeschini, 1995)

$$\sqrt{(p_1 - q_1)^2 + (p_2 - q_2)^2 + \dots + (p_n - q_n)^2} = \sqrt{\sum_{i=1}^n (p_i - q_i)^2}.$$

En base a esta información, se construyó una matriz en la cual se asignaron valores a las distancias entre los desplazamientos obtenidos para las fracciones y los desplazamientos de referencia. Este trabajo nos permitió construir un dendograma en el cual se evidenciaron agrupamientos en función de las fracciones que presentaron mayor similitud con los compuestos de referencia. Los agrupamientos permiten identificar a las fracciones obtenidas que tienen mayor similitud con los datos de desplazamiento de los compuestos de referencia.

El análisis de los dendogramas obtenidos nos permitió establecer que los compuestos aislados pertenecen al grupo de las isoflavonas, cuya estructura química presenta un esqueleto como el que se muestra a continuación.

G Isoflavonas



Genisteína – 5,7,4'-tri-OH
 Orobol – 5,7,4',5'-tetra-OH

5.6 Identificación de antocianinas por análisis de desplazamientos químicos en extractos totales de *Zea Mays* y *Vaccinium Floribundum*

Para identificar las antocianinas presentes en los extractos de las especies *Z. mays* y *V. floribundum*, se estudiaron sus desplazamientos con Cloruro de Aluminio. Las antocianidinas están químicamente basadas en una estructura aromática común. Las diferencias estructurales radican en la adición o substracción de grupos hidroxilos o por metilación o glicosilación (Harborne, 1998).

En los extractos estudiados se determinó la presencia de cianidina, por el desplazamiento de 18 nm con el reactivo $AlCl_3$. Este desplazamiento coincide con los datos reportados en bibliografía (ver cuadro 10).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con el presente estudio obtenemos las siguientes conclusiones y recomendaciones:

1. Mediante un estudio que combina técnicas cromatográficas y espectroscópicas se ha logrado identificar los grupos de compuestos fenólicos mayoritarios presentes en especies nativas de uso alimentario en nuestra región
2. El uso de reactivos de desplazamiento químico para identificar compuestos fenólicos es una herramienta asequible a las condiciones de trabajo de los laboratorios y que, mediante la ayuda de técnicas estadísticas multivariantes, puede conducir a la identificación de estructuras características de compuestos fenólicos.
3. En las especies en estudio se determinó la presencia de isoflavonas y se caracterizaron las antocianidinas de *Zea mays* y *Vaccinium floribundum*. En estas últimas especies se identificó a cianidina como la antocianidina mayoritaria.
4. Por el interés que involucra el estudio y caracterización de las plantas con usos tradicionales en nuestra región, los resultados obtenidos en este trabajo son relevantes pues nos permiten identificar a éstas plantas como fuente de compuestos fenólicos. Éstos compuestos están relacionados con actividad biológica beneficiosa para la salud de los consumidores, por lo cual este estudio puede utilizarse como una base para potenciar el uso de éstas especies tradicionales.
5. Se recomienda continuar con estudios similares en especies vegetales y ampliar su ámbito hasta llegar a la identificación estructural de los compuestos fenólicos aislados.

6. El presente estudio es complementado con otro trabajo realizado en la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay. Este trabajo se enfoca a la actividad antioxidante de las plantas referidas en este análisis.

BIBLIOGRAFIA

Referencias Bibliográficas

- AKUBUGWO et al.: Nutritive Value of *S. nigrum* Seed and Leaves. Physicochemical studies on oils from five selected Nigerian plant seeds, 2007, pp: 275-278.
- CALDERÓN, C. E.; "Los Colorantes Naturales y Los Alimentos", En: "Memorias del 1er. Simposio sobre Plantas Medicinales", Pontificia Universidad Javeriana, Santafé de Bogotá, 1992, pp. 101
- CALDERÓN, C. E.; "Los Colorantes Naturales y Los Alimentos", En: "Memorias del 1er. Simposio sobre Plantas Medicinales", Pontificia Universidad Javeriana, Santafé de Bogotá, 1992, pp. 157-182.
- CAO, G.; et al.: Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biol. Med.* 1997, 22, 749-760.
- CHACÓN, G. «Estudio Ecológico, fitoquímico y farmacológico de *Amaranthus caudatus*. Memoria del Primer Curso Nacional de Maca. Perú-Canadá, pp. 23-42. (1997)
- ECHEVERRI, L. "Espectroscopía de Productos Naturales", Universidad de Antioquia, Departamento de Química, Medellín, 1986, Capítulo V.
- FORINA, M., Lanteri, S., Armanino, G., y Leardi, R. (1993). Análisis Multivariante de Datos, en: Escuela de Quemimetría. Universidad del Azuay. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo.
- GARCÍA-BARRIGA, H.; "La Salud con las Plantas"; en: "Memorias del 1er. Simposio sobre Plantas Medicinales", Pontificia Universidad Javeriana, Santafé de Bogotá, 1992, pp. 49-71
- GIUSTI, M. Wrolstad, R. E. Anthocyanins. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. En *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*; Editorial John Wiley & Sons: New York, 2001, pp 1-13.

- GIUSTI, M. Wrolstad, R. E. Total Monomeric Anthocyanin by the pH differential method. En Current Protocols in Food Analytical Chemistry; Universidad de Meryland, 2001, pp F1.2
- HARBORNE, J.B, Phytochemical Methods, Editorial Chapman & Hall, Tercera Edición, 1998 pp128
- LAZO, R. 1999. Fertilización Potásica y Fosfórica en el Rendimiento de Maíz Morado (Zea mays) Tesis UNSA. El Cural-Arequipa-Perú pp 78.
- LOJAN IDROBO, Leoncio, El verdor de los Andes Ecuatorianos, Editorial 1997 pp89
- MABRY, T.J. Markham, K.R. and Thomas, M.B., 1970. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, Berlín.
- MARKHAM, K. Techniques of Flavonoid Identification, Editorial Academic Press, London-New York-Paris, 1982. Capítulo 3
- MARTÍNEZ M Alejandro., “Flavonoides”, Departamento de Química, Universidad de Antioquia, Medellín, 2005, Cap. I.
- RICE-EVANS, C. Miller, N. J.; Paganga, G. Structureantioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biol. Med. 1996, 20, 933-956
- SAITO, N.; Harborne, J. B.; PHYTOCHEMISTRY 1983 pp 28.
- T. FOSSEN, R. Slimestad and O. M. Andersen, Agricultural. Food Chemistry ., 49, 2318-232 (2001).
- TODESCHINI. Roberto. Introduzione alla Chemiometría Departamento de Ciencias del Ambiente Universidad de Milano. 1995. Capítulo 3. Análisis de Clusters
- WANG, H; et al.:Total antioxidant capacity of fruits. J. Agric. Food Chem. 1996, 44, 701-705.
- WANG, S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 140-146.
- WHITE, ALAN, Hierbas del Ecuador, Ataco. Editorial Curvan-Caya, 1986. pp 63

- WHITE, ALAN, Hierbas del Ecuador, Hierba Mora. Editorial Curvan-Caya, 1986, pp152-154

Referencias Electrónicas

- Fundación Eroski, Arándanos, <http://frutas.consumer.es/documentos/frescas/arandano/salud.php>, 01-06-08

ANEXOS

Anexo 1:

Matriz de datos en base a la comparación del patrón de desplazamientos químicos y máximos de absorción de *Solanum Nirgrum* y *V. Floribundum* Fracciones Fluorescentes

| | Nombre | 250-270nm | 275-295nm | 315-350nm | 350-385nm | 385-415nm | NaOMe 0-40nm | NaOAc 5-20nm | H ₃ BO ₃ 12-36 | AlCl ₃ 25-40 | NaOH 40-60 |
|----|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|--------------|--------------------------------------|-------------------------|------------|
| 1 | Flavonas | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | Flavonoles | 1 | 0.4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 3 | Flavanonas | 0 | 1 | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | Flavononoles | 0 | 1 | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | Isoflavonas | 1 | 0 | 0.25 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | Chalconas | 0.5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 7 | Auronas | 0.3 | 0.3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 8 | mo1 f1 | 0.4 | 0.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | mo1 f2 | 0.05 | 0.16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | mo 2 f1 | 0.63 | 0.5 | 0.2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

| | Nombre | AcNa 30-40 | AlCl ₃ 0-20 | AlCl ₃ 40-60 | NaOH 30-40 | NaOH 10-15 | AlCl ₃ 50-65 | Me Na 45-65 | AcNa 60 | H ₃ BO ₃ 0-12 | Ac Na in |
|----|--------------|------------|------------------------|-------------------------|------------|------------|-------------------------|-------------|---------|-------------------------------------|----------|
| 1 | Flavonas | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | Flavonoles | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | Flavanonas | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 4 | Flavononoles | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 5 | Isoflavonas | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 6 | Chalconas | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | Auronas | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | mo1 f1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | mo1 f2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | mo 2 f1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |

Anexo 2:

Matriz de datos en base a la comparación del patrón de desplazamientos químicos y máximos de absorción de *Zea Mays* ecotipos 1 y 2 Fracciones Fluorescentes

| | Nombre | 250-270 | 275-295 | 315-350 | 350-385 | 385-415 | NaOMe 0-40 | NaOAc 5-20 | H3BO3 12-36 | AlCl3 25-40 |
|----|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|------------|------------|-------------|-------------|
| 1 | Flavonas | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | Flavonoles | 1 | 0.4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 3 | Flavanonas | 0 | 1 | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | Flavononoles | 0 | 1 | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | Isoflavonas | 1 | 0 | 0.25 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 6 | Chalconas | 0.5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 7 | Auronas | 0.3 | 0.3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 8 | maiz 2 | 1 | 0.12 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 9 | maiz 1 f1 | 0.85 | 0.07 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 10 | maiz 1 f2 | 1 | 0.13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | Nombre | NaOH 40-60 | AcNa 30-40 | AlCl3 0-20 | AlCl3 40-60 | NaOH 30-40 | NaOH 10-15 | AlCl3 50-65 | Me Na 45-65 | AcNa 60 | H3BO3 0-12 |
|----|---------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|---------|------------|
| 1 | Flavonas | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 2 | Flavonoles | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 3 | Flavanonas | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 4 | Flavononoles | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 5 | Isoflavonas | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 6 | Chalconas | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | Auronas | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | maiz 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | maiz 1 f1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | maiz 1 but f2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Anexo 3:

Matriz de datos en base a la comparación del patrón de desplazamientos químicos y máximos de absorción de *Amaranthus Caudatus* Fracciones Fluorescentes

| | Nombre | 250-270 | 275-295 | 315-350 | 350-385 | 385-415 | NaOMe 0-40 | NaO Ac 5-20 | H3BO3 12-36 | AlCl3 25-40 |
|---|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | Flavonas | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 2 | Flavonoles | 1 | 0.4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 3 | Flavanonas | 0 | 1 | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | Flavononoles | 0 | 1 | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | Isoflavonas | 1 | 0 | 0.25 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 6 | Chalconas | 0.5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 7 | Auronas | 0.3 | 0.3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 8 | ataco f2 | 1 | 0.01 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | ataco f1 | 1 | 0.1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

| | Nombre | NaOH 40-60 | AcNa 30-40 | AlCl3 0-20 | AlCl3 40-60 | NaOH 30-40 | NaOH 10-15 | AlCl3 50-65 | MeNa 45-65 | AcNa 60 | H3BO3 0-12 |
|---|--------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------------|---------|------------|
| 1 | Flavonas | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 2 | Flavonoles | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 3 | Flavanonas | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 4 | Flavononoles | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 5 | Isoflavonas | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 6 | Chalconas | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | Auronas | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | ataco f2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 9 | ataco f1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

Anexo 4:

Matriz de datos en base a la comparación del patrón de desplazamientos químicos y máximos de absorción de *Amaranthus Caudatus* Fracciones Moradas

| | Nombre | 250-270 | 275-295 | 315-350 | 350-385 | 385-415 | 475-515 | NaOMe 0-40 | NaO Ac 5-20 | H3BO3 12-36 |
|---|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------------|-------------|-------------|
| 1 | Flavonas | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 2 | Flavonoles | 1 | 0.4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 3 | Flavanonas | 0 | 1 | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | Flavononoles | 0 | 1 | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | Isoflavonas | 1 | 0 | 0.25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 6 | Chalconas | 0.5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 7 | Auronas | 0.3 | 0.3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 8 | atco f1_M | 0.8 | 0.6 | 0.5 | 0.25 | 0.2 | 0.025 | 1 | 0 | 0 |
| 9 | ataco f2_M | 1 | 0.88 | 0.8 | 0.4 | 0.25 | 0.05 | 1 | 1 | 0 |

| | Nombre | AlCl3 25-40 | NaOH 40-60 | AcNa 30-40 | AlCl3 0-20 | AlCl3 40-60 | NaOH 30-40 | NaOH 10-15 | AlCl3 50-65 | MeNaO 45-65 | AcNa 60 |
|---|--------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|---------|
| 1 | Flavonas | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 2 | Flavonoles | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 3 | Flavanonas | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | Flavononoles | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 5 | Isoflavonas | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | Chalconas | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 7 | Auronas | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 8 | atco f1_M | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | ataco f2_M | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Anexo 5:

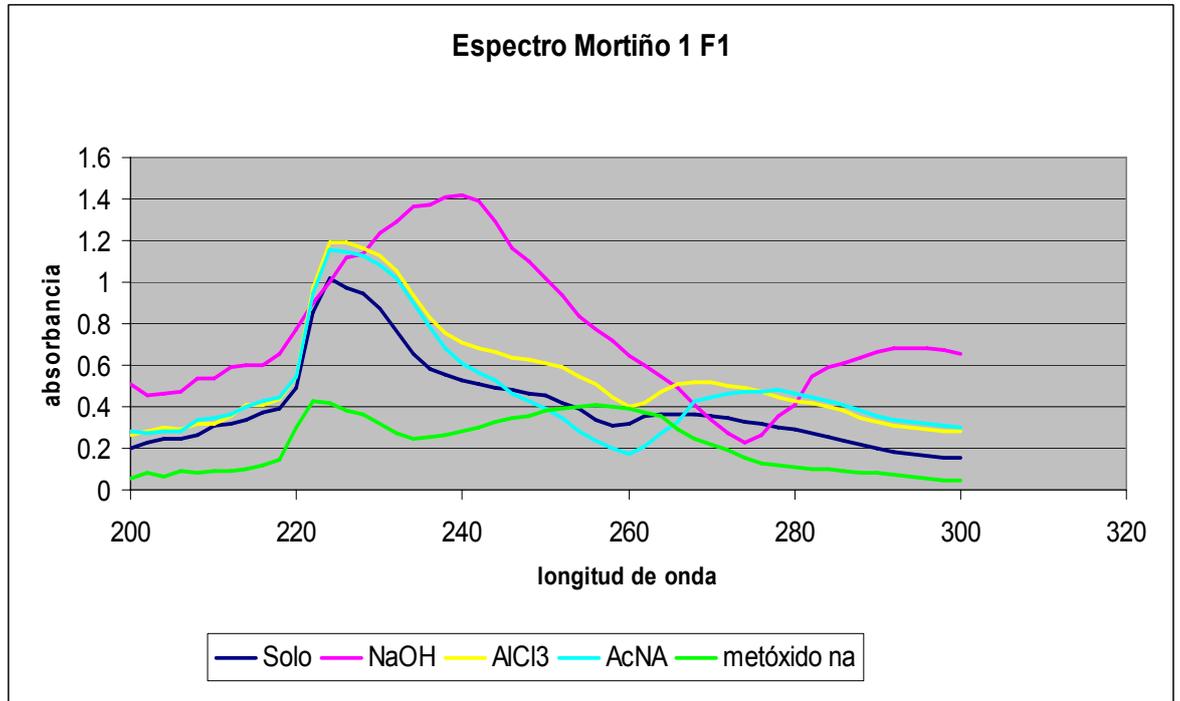
Matriz de datos de Antocianinas en base a la comparación del patrón de desplazamientos químicos y máximos de absorción de *Zea mays* ecotipos 1 y 2 y *Vaccinium Floribundum*.

| | Nombre | 250-270 | 275-295 | 315-350 | 350-385 | 385-415 | 475-515 | AICI3 |
|----|--------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|
| 1 | Hirsutidin | 0.5 | 0.25 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 1 | 0 |
| 2 | Malvidin | 0.5 | 0.25 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 1 | 0 |
| 3 | Petunidin | 0.5 | 0.25 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 1 | 24 |
| 4 | Delphinidin | 0.5 | 0.25 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 1 | 23 |
| 5 | Rosinidin | 0.5 | 0.25 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 1 | 0 |
| 6 | Peonidin | 0.5 | 0.25 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 1 | 0 |
| 7 | Cyanidin | 0.5 | 0.25 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 1 | 18 |
| 8 | Pelargonidin | 0.5 | 0.25 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 1 | 0 |
| 9 | Luteolinidin | 0.5 | 0.25 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 1 | 52 |
| 10 | Apigeninidin | 0.5 | 0.25 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 1 | 0 |
| 11 | maíz 1 f1_M | 0.25 | 0.27 | 0.25 | 0.26 | 0.2 | 1 | 16 |
| 12 | maiz 2 f1_M | 0.6 | 0.7 | 0.5 | 0.5 | 0.25 | 0.7 | 16 |
| 13 | mo 2 f1_M | 0.76 | 0.67 | 0.4 | 0.25 | 0.18 | 0.5 | 18 |

Anexo 6:

Espectro de absorción UV de Solanum Nigrum Fracción 1.

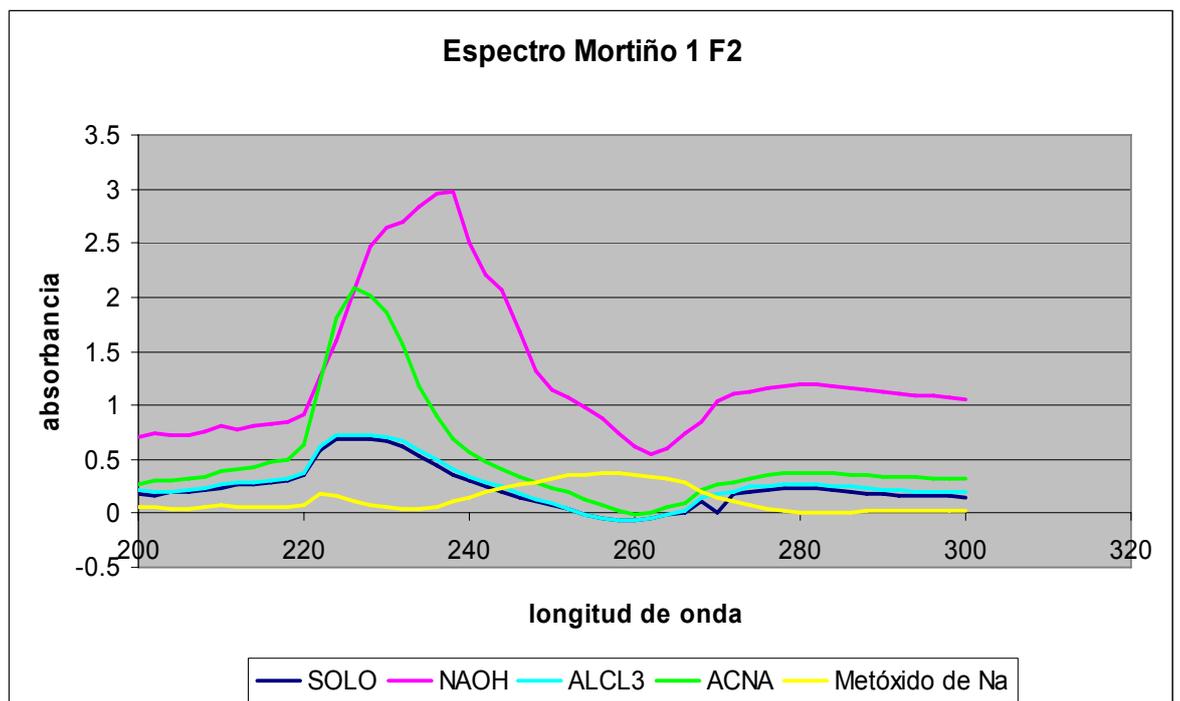
Fluorescente.



Anexo 7:

Espectro de absorción UV de Solanum Nigrum Fracción 2.

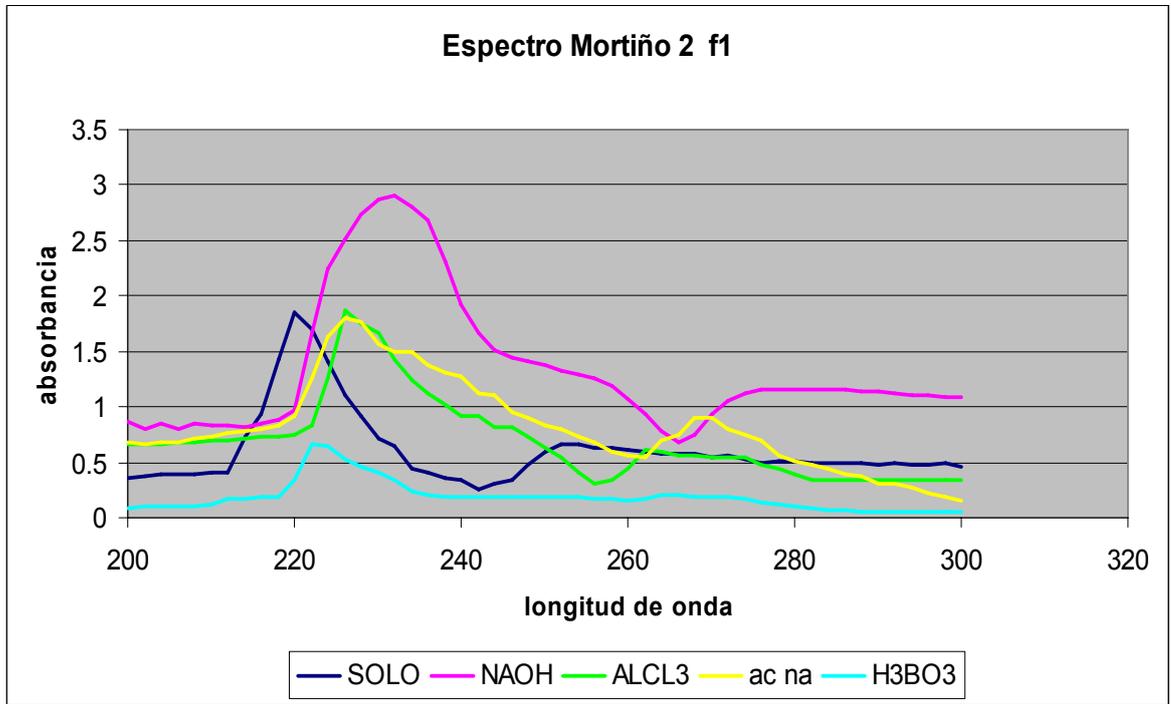
Fluorescente.



Anexo 8:

Espectro de absorción UV de Vaccinium Floribundium Fracción 1.

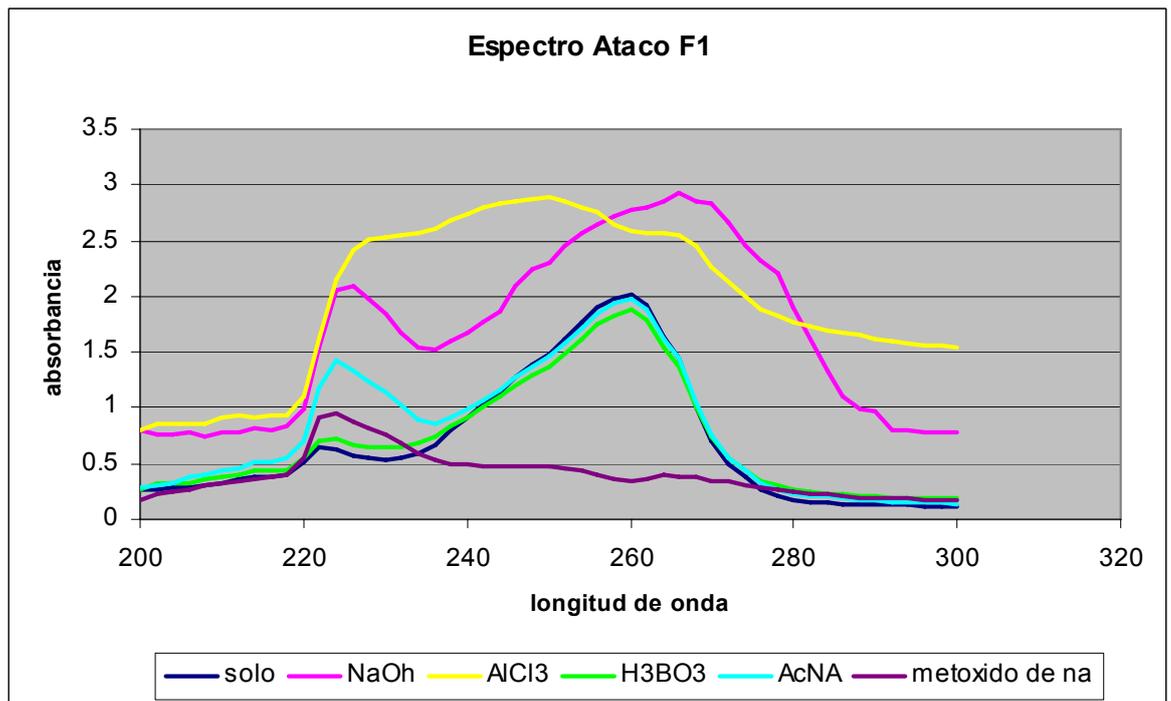
Fluorescente.



Anexo 9:

Espectro de absorción UV de Amaranthus Caudatus Fracción 1.

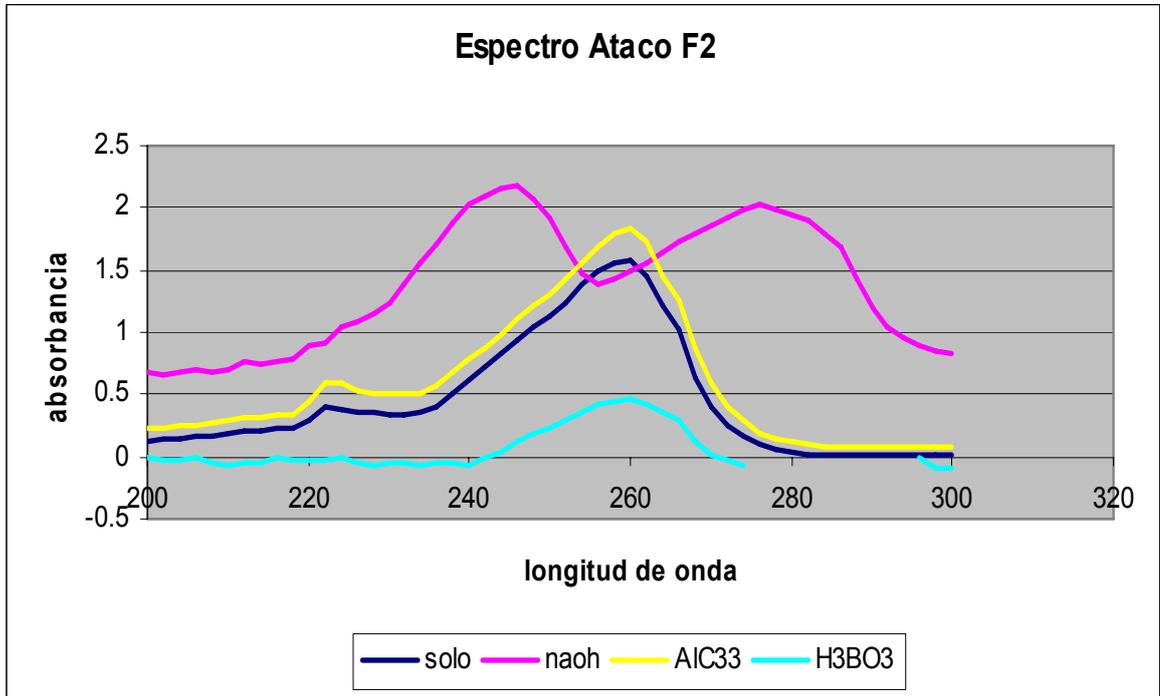
Fluorescente.



Anexo 10:

Espectro de absorción UV de Amaranthus Caudatus Fracción 2.

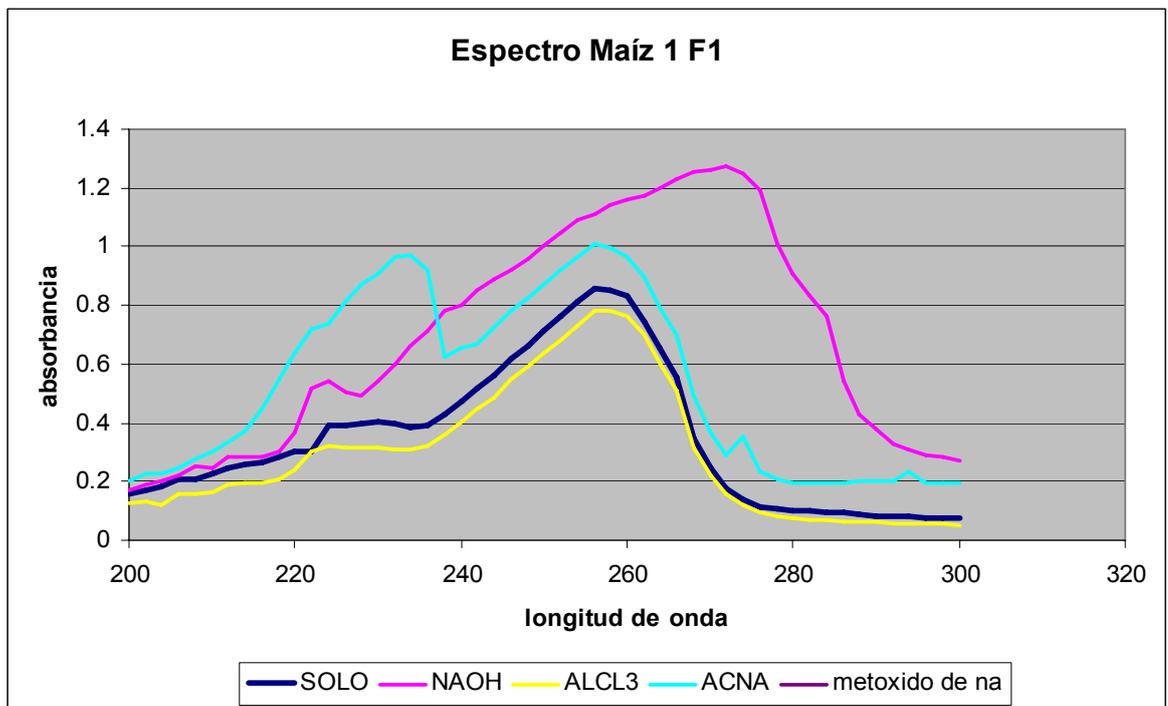
Fluorescente.



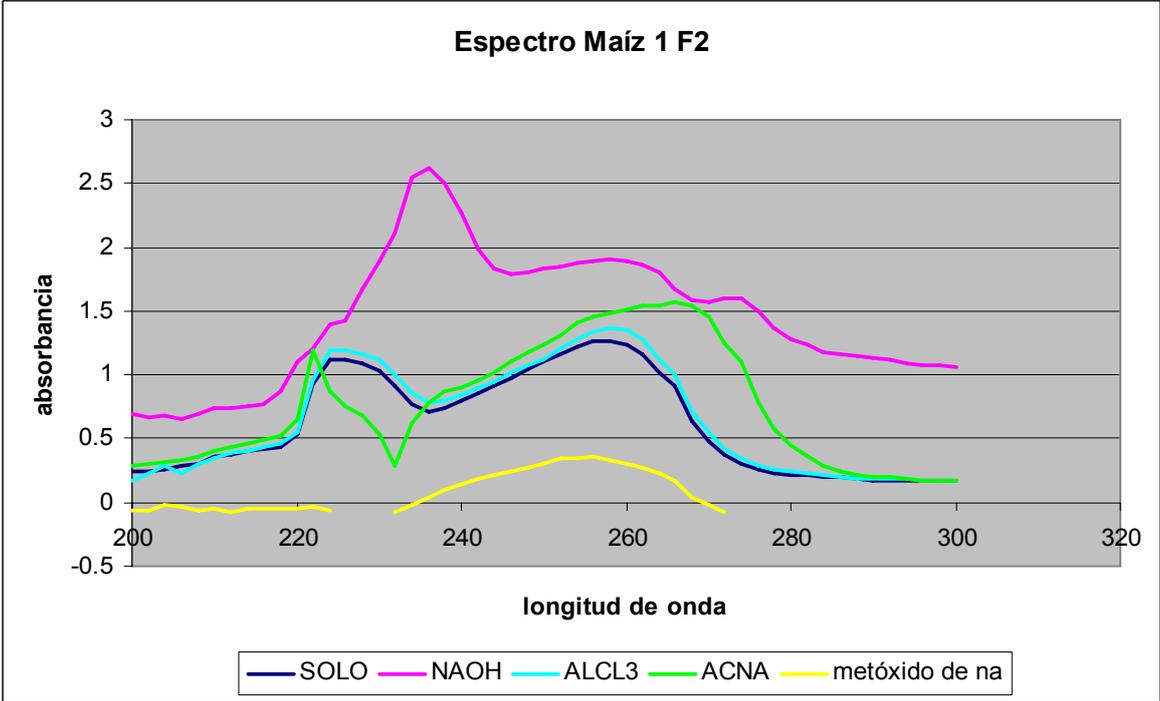
Anexo 11:

Espectro de absorción UV de Zea Mays, ecotipo 1 Fracción 1.

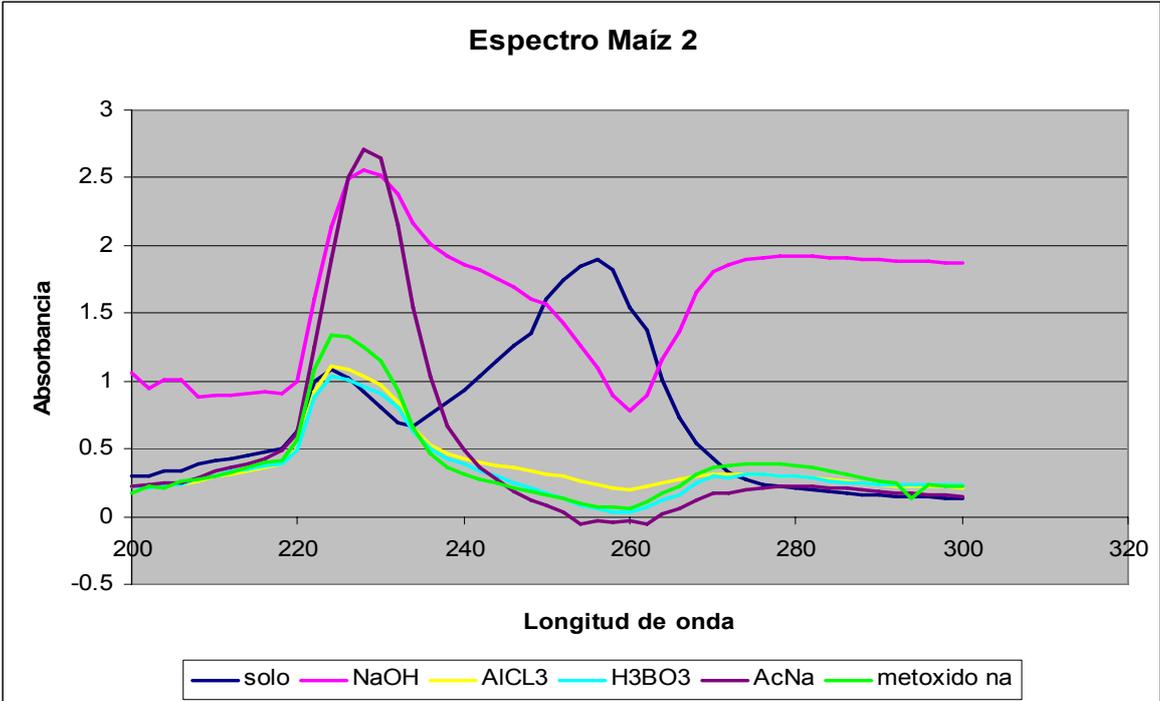
Fluorescente.



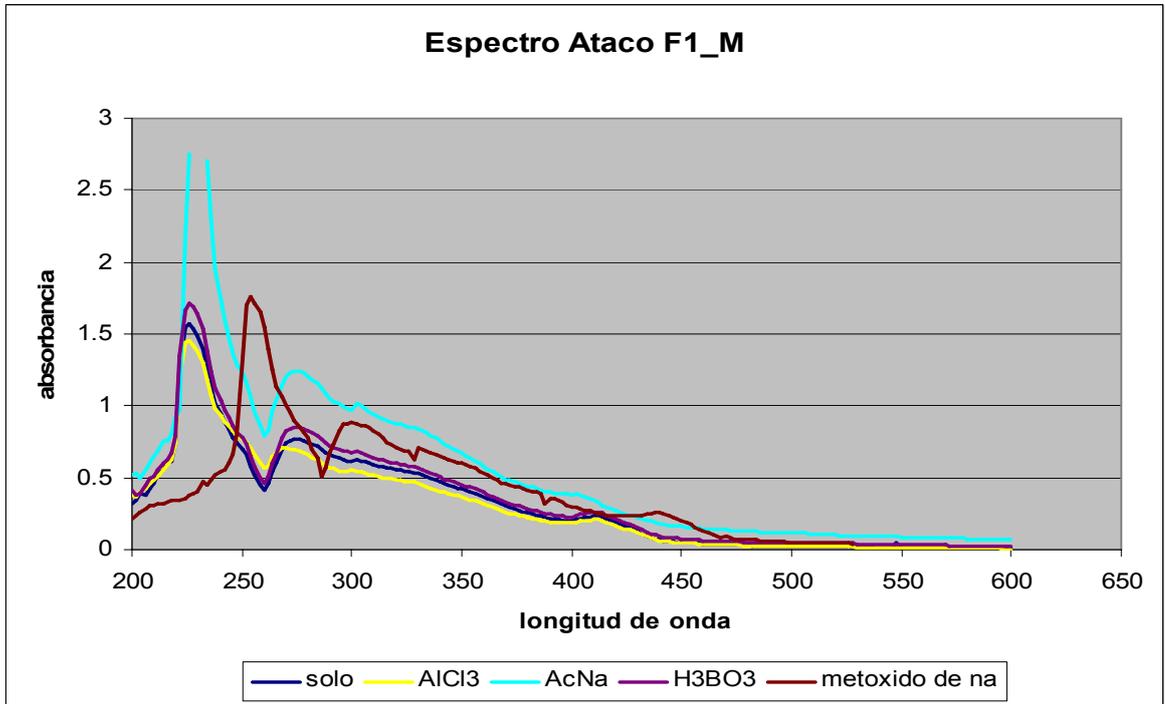
Anexo 12:
Espectro de absorción UV de Zea mays, ecotipo 1 Fracción 2.
Fluorescente



Anexo 13:
Espectro de absorción UV de Zea Mays, ecotipo 2 Fracción 1.



Anexo 14:
Espectro de absorción UV de Amaranthus Caudatus Fracción 1. Violeta



Anexo 15:
Espectro de absorción UV de Amaranthus Caudatus Fracción 2. Violeta

