

# CARACTERIZACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS DE LOS FRUTOS

de *Berberis boliviana* Lechler "Ch'iqchi" (\*)

Carla DEL CARPIO JIMÉNEZ, Carlos SERRANO FLORES,  
Juan HE, Qíngguo TIAN, Steven J. SCHWARTZ, M. Mónica GIUSTI

## RESUMEN

*Berberis boliviana* Lechler es una planta perteneciente a la Familia Berberidaceae, su fruto es una pequeña baya morada comestible y el análisis preliminar de su pigmento determinó la presencia de antocianinas.

El contenido en antocianinas monoméricas fue determinado por el método del pH diferencial, siendo de 7 g / 100 g en el tejido separado de las semillas del fruto seco.

El análisis por HPLC-PDA (Cromatografía Líquida de Alta Resolución, con detector con arreglo de fotodiodos) de la muestra hidrolizada mostró la presencia de 5 aglicones: delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, las cuales fueron identificadas por comparación de los picos del cromatograma obtenido al correr simultáneamente una muestra del pigmento de los frutos de uva (*Vitis vinifera*).

El análisis por HPLC - espectrometría de masas Tandem confirmó la presencia de 10 picos y los pesos moleculares permitieron conocer las antocianinas presentes en *Berberis boliviana* Lechler: delfinidina-3-glucósido, delfinidina-3-rutinósido, cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinósido, petunidina-3-glucósido, petunidina-3-rutinósido, peonidina-3-glucósido, peonidina-3-rutinósido, malvidina-3-glucósido y malvidina-3-rutinósido. La petunidina-3-glucósido fue identificada como el principal pigmento, en un 24,43%.

Esta es la primera vez que se establece el perfil de las antocianinas de *Berberis boliviana* Lechler.

## INTRODUCCIÓN

Las antocianinas son los componentes que otorgan a las plantas colores rojos, azules, morados, particularmente en partes como frutos, flores y hojas (Rein, 2005:9-10). Estos pigmentos fueron consumidos por los hombres a lo largo de incontables generaciones sin causar aparentemente ningún efecto tóxico (Markakis, 1982: 245-246). Las antocianinas pertenecen a un gran y muy distribuido grupo de metabolitos secundarios que se conocen colectivamente como flavonoides. Las antocianinas naturales más comunes son las 3-O-glicósidos y las 3,5 di-O-glicósidos (Cao y col., 2001: 920-962).

(\*) El presente artículo es parte de la tesis de maestría: Estudio del colorante de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler "Ch'iqchi", cuyo resumen fue presentado en el 2006 IFT Annual Meeting and Food Expo, llevado a cabo del 24 al 26 de Junio del 2006 en Orlando, Florida, USA.

Mi reconocimiento y agradecimiento al Dr. Steven Schwartz, por haber autorizado el desarrollo de este trabajo de investigación en los laboratorios de la Facultad de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Ohio State University, Ohio, USA. Asimismo, mi profundo agradecimiento a la Dra. Mónica Giusti, compañera, que realizó hospitalidad en dicha casa de estudios y quien asumió la responsabilidad de guiarne mientras realizaba la pasantía y al Mgr. Carlos Serrano Flores, por la asesoría y orientación brindada en la ejecución de la caracterización de los frutos, parte del trabajo que fue ejecutada en el laboratorio de Química Orgánica de la UNSAAC.

El interés por las antocianinas se ha incrementado debido a su potencial uso como colorantes naturales y por sus potenciales beneficios en la salud (Giusti y col., 1999a: 4631-4637).

En el reino vegetal, la familia Vitacea con su género *Vitis*, al cual pertenece la especie *Vitis vinifera* (uva) es la fuente más importante de antocianinas en la actualidad debido a que es la planta alimenticia más cultivada y con la cual se produce el vino (Rein, 2005:14).

Otras familias importantes por su contenido antocianínico son; la Rosacea y la Ericaceae, la primera incluye a los géneros *Fragaria* (fresas) y *Rubus* (frambuesa) y la última al género *Vaccinium* (arándano). Asimismo, las familias Saxifragaceae (Rein, 2005:14-15), Solanaceae y Cruciferae (Lohachoompol y col., 2004:248-252; Lock de Ugaz, 1990:106).

Últimamente, la seguridad de los pigmentos sintéticos ha sido cuestionada, conduciendo a la reducción en el número de colorantes permitidos (Feakes y Giusti, 2003). Las antocianinas son pigmentos solubles en agua, lo que facilita su incorporación en los sistemas acuosos alimentarios (Markakis, 1982: 245-246 ; Mozetic y col., 2002:207-212). Estas cualidades hacen que estos colorantes naturales sean atractivos como pigmentos naturales inocuos con considerable potencial en la industria alimentaria de productos con un rango de pH ácido.

Además de su color, se ha reportado que las antocianinas tienen beneficios para la salud como potentes antioxidantes y pueden incrementar la agudeza visual. Se ha observado también que poseen actividad antineoplásica, vasotónica, vasoprotectora, anti - inflamatoria y hepatoprotectora (Jin y Lian, 2003: 923-933).

*Berberis boliviana* Lechler, es una especie silvestre del Perú (Brako y Zarucchi, 1993) que crece especialmente alrededor de los campos de cultivo a manera de protección, debido a sus espinas grandes y filudas; sus nombres comunes son Cheq̄che, Qeswa cheq̄che, Quisca-quisca, Ailampo.

Existe información sobre esta especie en Perú desde tiempos de la Conquista; especialmente, el cronista Bernabé Cobo describió a esta planta con el nombre común de Quisca-quisca, que significa planta espinosa, con unas pequeñas flores amarillas y espinas filudas (Yacovleff y Herrera, 1935: 501), cuyos frutos dan un suave color morado cuando son usados como colorante. Asimismo, algunas tradiciones orales, sugieren que estos frutos eran usados por las ñustas durante el Incanato para lavar y cuidar sus cabellos a manera de un champú colorante natural.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente la importancia del estudio de las antocianinas radica fundamentalmente, en su potencial de utilización en la industria alimentaria como colorantes. Desde hace unos años se vienen aplicando en el campo internacional restricciones progresivas al empleo de colorantes sintéticos (Xueming y col., 2004:326-331) en productos alimentarios, en particular en lo que se refiere a los derivados azoicos y a otros colorantes sintéticos (Feakes y Giusti, 2003), debido a que estos han sido involucrados en reacciones adversas para el ser humano.

El carmin ha sido usado en la industria como un colorante natural, aunque un pequeño pero creciente número de consumidores han reportado reacciones alérgicas, limitando su uso como un ingrediente alimentario (Feakes y Giusti, 2003).

Para evitar poner a la venta productos bajo un aspecto menos atrayente, se han intensificado las investigaciones para la búsqueda de colorantes naturales extraídos de diversos frutos, flores y otras partes vegetales que son capaces de sintetizar compuestos rojos, sobretodo antocianinas, las cuales carecen de efectos tóxicos (Lock de Ugaz, 1990:95-116).

Debido al interés incrementado de los consumidores en los productos naturales, la industria está constantemente buscando alternativas naturales adecuadas al uso de colorantes sintéticos (Feakes y Giusti, 2003). Por este motivo, siendo *Berberis boliviana* Lechler una planta silvestre del Perú y una potencial fuente de suministro de antocianinas, su estudio contribuirá a elucidar su estructura y sus características más sobresalientes para poder evaluar posteriormente su potencial uso como colorante en la industria alimentaria, cosmética e incluso farmacéutica.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Caracterizar los componentes antocianicos presentes en el colorante de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler a través de técnicas HPLC y espectrometría de masas.

### Objetivos específicos:

1. Realizar la caracterización estructural de las antocianinas presentes en los frutos.
2. Caracterizar los frutos de *Berberis boliviana* Lechler.
3. Cuantificar y determinar la pureza del contenido antocianico de los frutos.
4. Identificar las principales antocianinas presentes en el pigmento de los frutos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Para la investigación se colectaron 623 g de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler, entre los meses de febrero y abril de 2004, meses en los cuales los frutos se encuentran completamente maduros y presentan la máxima coloración morada; fueron colectados en la localidad de Pata Pata, San Jerónimo, Cusco.

La planta fue identificada por comparación con especímenes del herbario Vargas CUZ de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC) por el M. Sc. Alfredo Tupayachi Herrera, habiéndose realizado el depósito de un espécimen.

### Antocianinas estándar y Reactivos químicos

Los extractos concentrados de antocianinas comercialmente disponibles de *Vaccinium myrtillus* L y *Aronia melanocarpa* E. fueron proporcionados por Artemis International, Inc (Fort Wayne, IN); el extracto de uva (*Vitis vinifera*) fue proporcionado por Polyphenolics, Inc (Madera, CA) y el extracto de Rabanito rojo (*Raphanus sativus*) fue proporcionado por la Dra. Mónica Giusti.

El acetonitrilo, el metanol, la acetona, el ácido fórmico usados fueron de grado HPLC y se obtuvieron de Fisher Scientific (Fair Lawn, N.J).

## MÉTODOS

### Caracterización de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler

Fueron determinados signos de maduración como longitud, peso (Hernández Gil, 2002: 225-233), color (usando un colorímetro Minolta CR-300, Minolta Corporation, New Jersey, USA), pH (determinado directamente en el jugo de los frutos usando de un pH metro) y el contenido acuoso mediante el método gravimétrico.

Otros análisis desarrollados fueron, determinación de parámetros bromatológicos como contenido proteico (Método Kjeldahl), grasas (usando la extracción de muestras pequeñas en cloroformo/metanol/agua), fibra (evaluación gravimétrica) y carbohidratos (cuantificación colorimétrica).

Extracción del pigmento con acetona y cloroformo para la cuantificación e identificación de antocianinas por HPLC y Espectro de masas (Wrolstad y Acree, 2001:F1.1.1-F1.3.9).

Los frutos secos congelados de *B. boliviana* Lechler (2,996 g) fueron separados de sus semillas; siendo licuados con una solución agua / acetona (30:70 v/v) y luego se filtró usando un embudo Buchner. La torta residual del filtrado fue nuevamente reextraída con la solución agua /acetona (30: 70 v/v) hasta obtener una solución clara. Los filtrados fueron combinados, llevados a una pera de decantación, agregándose cloroformo. La porción acuosa (parte superior) fue colectada y colocada en un rotavapor Büchi a 40°C durante 5 a 10 minutos, hasta que la acetona residual se evapora. El extracto acuoso fue llevado hasta un volumen conocido (100mL) usando agua destilada.

**Cuantificación del total de antocianinas mediante el método del pH diferencial**

(Wrolstad y Acree, 2001: F1.1.1-F1.3.9)

Las antocianinas desarrollan transformaciones estructurales reversibles con el cambio del pH manifestado por el espectro a diferentes absorbancias. La forma del oxonio coloreado predomina a pH 1,0 y la forma hemiacetal incolora a pH 4,5.

El método del pH diferencial se basa en esta reacción y permite segura y rápidamente medir el total de antocianinas monoméricas (Giusti y Wrolstad, 1996:322-326) Se utilizó un espectrofotómetro UV- visible Hewlett Packard 8453, las mediciones fueron realizadas a 520 (máxima longitud de onda determinada) y a 700 nm.

El contenido de antocianinas monoméricas fue calculado como Cianidina-3-glucósido, usando como coeficiente de extinción molar  $26\ 900\ \text{L cm}^{-1}\text{mg}^{-1}$  y como peso molecular  $449.6\ \text{g L}^{-1}$  (Wrolstad y Acree, 2001: F1.1.1-F1.3.9). Se calculó un factor de dilución de 180. Los cálculos se realizaron usando las siguientes fórmulas:

**Fórmula 1:** Cálculo de la absorbancia de la muestra.

$$^*A = (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

**Fórmula 2:** Cálculo del contenido de antocianinas.

$$\text{Contenido de antocianinas (p/p)} = (A \times MW \times DF \times V / Wt) / (e \times l)$$

Donde:

 $^*A$  = Absorbancia de la muestra

MW = Peso molecular de la cianidna-3-glucósido (449,6 g/L)

DF = Factor de dilución (180)

V = Volumen final en mL

Wt = Peso de la muestra en mg

e = Absortividad molar de la cianidina-3-glucósido ( $26\ 900\ \text{L cm}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )

l = Grosor de la cubeta (1cm)

**Hidrólisis ácida de las antocianinas. Método para la determinación de los aglicones (Antocianidinas)** (Wrolstad y Acree, 2001: F1.1.1-F1.3.9).

El objetivo de este método es lograr obtener los aglicones, por separación de los azúcares y otras sustancias como ácidos ligados a la estructura antocianina, con el único propósito de identificar las antocianidinas presentes en el pigmento.

En un tubo de ensayo se disolvió el extracto acuoso acidificado (1mL) con 10 mL de HCl 4N; se puso en contacto el contenido con gas nitrógeno y se tapó herméticamente. El pigmento fue hidrolizado durante 45 minutos a  $100^{\circ}\text{C}$ , luego se enfrió en un baño de hielo. El hidrolizado fue purificado usando un cartucho C-18<sup>®</sup>.

**Determinación de las antocianinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-PDA)** (Hong y Wrolstad, 1990: 708-715)

El HPLC es el método más común para realizar el análisis de antocianinas y es efectivo para la mayor parte de productos vegetales de contenido antocianínico.

La muestra fue semi purificada usando un cartucho C-18 y la fracción fenólica (conteniendo antocianinas) fue eluida con metanol acidificado con HCl 1%; se evaporó el metanol en un rotavapor

Büchi; se usó agua acidificada con HCl 0.01% para lograr un volumen conocido y se filtró usando un filtro de polipropileno Whatman de 0,45 mm antes de la inyección en el equipo HPLC. La separación de las antocianinas se llevó a cabo en una columna C-18 Waters Symmetry (4.6mm x 150mm, 3.5mm) usando un sistema HPLC que constaba de un módulo de separación Waters 2695, equipado con un detector con arreglo de fotodiodos (PDA) Waters 2996, un software Empower y un automuestreador Waters 717 plus.

El rango de flujo fue de 0,8 mL/min, la fase móvil: A, ácido fórmico al 10% en agua grado HPLC; B, Acetonitrilo, la gradiente utilizada fue: 0-1 min 95% A y 5% de B; 2 min 90% A y 10% B; 20 min 80% A y 20% B y a los 25 min 95% A y 5% B.

Se realizó una detección simultánea a las longitudes de onda: 520 nm para antocianinas, 280 nm para compuestos fenólicos y a 320 nm para ácidos cinámicos. La identificación de los picos de las antocianinas fue realizado en base a la comparación de los cromatogramas y tiempos de retención de los extractos concentrados de antocianinas de las especies *Vaccinium myrtillus* (arándanos) y *Aronia melanocarpa* (Chokeberry), corridos bajo las mismas condiciones especificadas anteriormente.

**Determinación de antocianinas por HPLC- MS/MS (Espectro de masas tandem)** (Hong y Wrolstad, 1986:199-207; Giusti y col., 1999b:4657-4664)

La espectrometría de masas se basa en la medida directa de la relación de la masa, con el número de cargas elementales positivas o negativas de los iones ( $m/z$ ) en la fase gaseosa obtenida de la sustancia a analizar. Esta relación se expresa en unidades de masa atómica ( $u$ ), ( $1u =$  la doceava parte de la masa de un átomo de carbono 12) o en daltons ( $1 Da =$  a la masa del átomo de hidrógeno) (Real Farmacopea Española, 2002:40-42).

En este estudio se han utilizado el análisis del ión precursor, análisis del producto iónico, análisis de pérdida neutral común y la monitorización selectiva de reacción que son parte de la espectrometría de masas tandem (MS-MS), la cual tiene la ventaja de lograr dos separaciones de los componentes de la muestra, siendo ambas separaciones iónicas, debido a esta especificidad, esta técnica es usada para lograr análisis cuantitativos de analitos en mezclas simples en cuestión de minutos sin necesidad de una separación cromatográfica u otro tratamiento químico que elimine interferentes.

Para la caracterización de cada una de las antocianinas se utilizó la monitorización selectiva de reacción (SRM) y el análisis del ión precursor, el cual detecta todos los iones precursores en una muestra que se fragmenta como un producto iónico común, en tanto que el análisis de pérdida neutral común detecta aquellos iones precursores que se fragmentan para producir iones con una diferencia común en  $m/z$  producida por la pérdida de un fragmento característico de un producto o de una familia de compuestos (Real Farmacopea Española, 2002:40-42).

La separación de las antocianinas fue llevada a cabo en una columna C-18 Waters Symmetry (4.6 x 75 mm, 3.5mm), se usó un sistema HPLC acoplado a un detector con arreglo de diodos (PDA) Waters 2996 y a un espectrómetro de masas con un túnel de triple cuadrupolo (Quattro Ultima, Micromass, UK Limited, Manchester, UK). El rango de flujo del HPLC se estableció en 1 mL/min, la fase móvil: A, ácido fórmico al 10%; B, acetonitrilo, la gradiente usada; 0-20 min, 100%-85% A; 20-25 min, 85%-100% A. El espectro de absorción de las antocianinas fue realizado en el rango 200 - 600 nm. Los espectros de masas fueron obtenidos usando la Monitorización Selectiva de Iones (SIM). Aproximadamente 100 mL del eluato del HPLC fueron separados por una microválvula y se depositaron en la fuente ESI. El cuadrupolo fue operado según las siguientes condiciones: Voltaje capilar 3,2 kV, voltaje de cono 35 V, RF lense 1,50 V, temperatura del gas de desolvation 500°C con un flujo de 269 L/h, temperatura de la fuente 105°C, presión de colisión de gas (Argón) 7 psi; la energía de colisión fue establecida en 25 eV.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### De la caracterización de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler

Los frutos inmaduros tienen una longitud promedio de  $7,13 \pm 0,729$  mm y un peso promedio de  $0,0625 \pm 0,017$  g, siendo de color verde pálido. Los frutos maduros tienen una longitud promedio de  $7,05 \pm 0,355$  mm y un peso promedio de  $0,1025 \pm 0,016$  g, teniendo un color morado oscuro característico ( $L^* = 33,26$ ,  $a+0,19$ ,  $b-0,90$ ), un rango de pH que varía de 3,81 a 3,84, un contenido acuoso de 56,30%.

El contenido proteico es de 0,94%; el grasas, 0,52%; en fibra, de 7,40% y el de carbohidratos fue de 39,96%. La bioquímica de maduración de las bayas (berries) explica algunos de los resultados; así por ejemplo, la diferencia de peso entre los frutos maduros e inmaduros podría deberse a que en los frutos maduros existen más sustancias de síntesis y mayor contenido acuoso (Hernández Gil, 2002:225-233).

El crecimiento de las bayas tiene un modelo definido y presenta 3 fases; la primera, con una división activa y una elongación celular; la presencia de clorofila en buena concentración hace que el fruto tenga el color verde. En la segunda fase, denominada como de detención del crecimiento, hay un cambio en el color de la cubierta debido a que se inicia la síntesis de las antocianinas. La tercera fase, en la cual existe un incremento en la síntesis de antocianinas, el contenido de los azúcares se incrementa y la cantidad de la clorofila disminuye (Hernández Gil, 2002:225-233).

Las muestras recolectadas de *Berberis boliviana* Lechler fueron comparadas con muestras del Herbario Vargas CUZ (UNSAAC - Cusco) por el MSc. Alfredo Tupayachi Herrera y tiene la siguiente posición taxonómica de acuerdo con el sistema de Judd, Campbell, Kellogg & Stevens (1999): División: Magnoliophyta (= Angiosperms), Clase: Magnoliopsida (= Tricolpates - Eudicots), Sub Clase: Magnoliidae (= Magnoliid - Complex), Orden: Ranunculales, Familia: Berberidaceae, Género: *Berberis*, Especie: *Berberis boliviana* Lechler.

### De la cuantificación del total de antocianinas mediante el método del pH diferencial.

Las antocianinas se encuentran en una concentración en peso del producto de **7g / 100g** de antocianinas presentes en el fruto seco separado de las semillas de *Berberis boliviana* Lechler, sabiendo que los frutos frescos presentan un contenido de humedad de 56,30%, pudimos realizar una aproximación al contenido de antocianinas en tejido epidérmico fresco, siendo de **1 500 mg/100g** de frutos.

El contenido en antocianinas en estos frutos es bastante alto, comparado con algunas otras fuentes ricas en antocianinas como arándanos (*Vaccinium myrtillus*) que son una fuente muy conocida y con un alto contenido en antocianinas (300 - 320 mg/100g de fruto fresco), sauco (*Sambucus nigra*) que tiene 450 mg / 100g de fruto fresco (Wrolstad y Acree, 2001: F1.1.1-F1.3.9), se puede concluir que los frutos de *Berberis boliviana* Lechler constituyen una fuente bastante rica de antocianinas.

### De la hidrólisis ácida del pigmento de *Berberis boliviana* Lechler. Método para la determinación de aglicones (Antocianidinas).

Al someter el hidrolizado a un análisis HPLC, se verificó la presencia de 5 aglicones, simultáneamente, se realizó la hidrólisis y posterior análisis HPLC de dos extractos concentrados de antocianinas, *Vitis vinifera* (Uva) y *Raphanus sativus* L (Rabanito rojo) para tener patrones de comparación que nos ayuden a identificar los picos del cromatograma. Todas las muestras fueron analizadas bajo las mismas condiciones.

Al comparar los cromatogramas (Figura N° 1), el perfil de elución de las antocianidinas presentes en los frutos de *Berberis boliviana* Lechler, coincide exactamente con el de los frutos de *Vitis vinifera* que es una fuente muy conocida y bien estudiada de 5 aglicones; a saber, cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina y petunidina, en tanto que la antocianidina presente en *Raphanus sativus*, la pelargonidina, no se encuentra presente ni en *Berberis boliviana* L ni en *Vitis vinifera*, los 5 aglicones identificados son: delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina (Figura N° 1).

### De la determinación de antocianinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-PDA)

Se obtuvieron cromatogramas a diferentes longitudes de onda, 280nm, 320nm y 520nm con la finalidad de determinar compuestos fenólicos, ácidos hidroxicinámicos y antocianinas respectivamente, como se muestra en la Figura N° 2. La separación por HPLC del extracto purificado de antocianinas de *Berberis boliviana* Lechler mostró la presencia de 10 antocianinas (Figura N° 3).

Al comparar los cromatogramas (B) y (C) de la Figura N° 2, correspondientes a 520 nm y 280 nm, respectivamente, se verifica que las antocianinas serían los únicos compuestos fenólicos presentes en los frutos de *Berberis boliviana* Lechler, debido a que no existen diferencias significativas entre ambos cromatogramas, este hecho es sumamente importante debido a que se trataría de una fuente natural de composición exclusivamente antocianina; asimismo, la cantidad de ácidos hidroxicinámicos es muy pequeña, pues como se muestra en el cromatograma (A) presentan absorbancias muy reducidas, menores de 0,1AU (Unidades de Absorbancia), demostrándose su baja concentración.

Para determinar la identidad de los picos presentes en el cromatograma obtenido, fue necesario utilizar extractos concentrados de antocianinas de *Vaccinium myrtillus* y *Aronia melanocarpa*, los cuales fueron corridos bajo las mismas condiciones; ambas especies tienen 3 azúcares diferentes unidos a sus antocianinas, galactosa, glucosa y arabinosa, la comparación de los cromatogramas determinó que uno de los azúcares presentes en el pigmento de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler, es la glucosa (Figura N° 4); asimismo, se pudieron identificar sólo 5 antocianinas como se muestra en los cromatogramas de la Figura N° 5, estas son: delphinidina-3-glucósido, cianidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido y malvidina-3-glucósido.

### De la determinación de antocianinas por HPLC-MS/MS (Espectro de masas tandem)

**El pico 1**, tiene un ión molecular ( $M^+$ ) a  $m/z$  465 y un ión de fragmentación a  $m/z$  303 el cual corresponde a la delphinidina, habiendo pérdida de una masa molecular de 162 que corresponde a una unidad glucosilo, por lo que se concluye que el pico 1 corresponde a la Delphinidina-3-glucósido.

**El pico 2**, contiene un ión molecular ( $M^+$ ) a  $m/z$  611 y evidencia de la presencia de una delphinidina a  $m/z$  303, habiendo pérdida de una masa molecular de 308, lo que corresponde a la ruptura de un ramnosilo y de un glucosilo, que corresponde a la masa molecular de una rutinosa, siendo esta la Delphinidina-3-rutinósido.

**El pico 3**, mostró un ión molecular ( $M^+$ ) a  $m/z$  449 y la presencia de una cianidina por el fragmento iónico a  $m/z$  287, habiendo pérdida de una masa molecular de 162, lo que corresponde a una unidad glucosilo, identificándose la Cianidina-3-glucósido.

**El pico 4**, con un ión molecular ( $M^+$ ) a  $m/z$  595 y un ión de fragmentación a  $m/z$  287, lo que corresponde a una cianidina, se observa la pérdida de una masa molecular de 308, que corresponde a la ruptura de una unidad de ramnosilo y glucosilo, siendo la antocianina presente la Cianidina-3-rutinósido.

**El pico 5**, con un ión molecular ( $M^+$ ) de  $m/z$  479 y un ión de fragmentación de 317 que corresponde a una petunidina, observándose pérdida de una masa molecular de 162, identificándose la petunidina-3-glucósido.

**El pico 6**, tiene un ión molecular ( $M^+$ )  $m/z$  625 y un ión de fragmentación a  $m/z$  317, que corresponde a la petunidina, observándose pérdida de una masa molecular de 308, correspondiendo a una rutinosa, siendo la antocianina identificada la petunidina-3-rutinósido.

**El pico 7**, con un ión molecular ( $M^+$ )  $m/z$  463 y un ión de fragmentación  $m/z$  301 que corresponde a la peonidina, mostrando la pérdida de una masa molecular de 162, siendo la antocianina identificada la peonidina-3-glucósido.

**El pico 8**, con un ión molecular ( $M^+$ )  $m/z$  609 y un ión de fragmentación a  $m/z$  301, que corresponde a la peonidina, habiendo una pérdida de masa molecular de 308, que corresponde a una unidad de rutinosa, siendo la antocianina presente la peonidina-3-rutinósido.

**El pico 9**, con un ión molecular ( $M^+$ )  $m/z$  493 y un ión de fragmentación a  $m/z$  331, que corresponde a la malvidina, observándose además la pérdida de una masa molecular de 162, determinándose la malvidina-3-glucósido.

**El pico 10**, contiene un ión molecular ( $M^+$ )  $m/z$  639 y un ión de fragmentación  $m/z$  de 331 que corresponde a la malvidina, observándose la pérdida de una masa molecular de 308, que corresponde a una rutinosa, determinándose la malvidina-3-rutinósido. (Ver Figura N° 6).

En algunos casos en los que los pesos moleculares son idénticos y no se puede distinguir entre uno y otro, es necesario acudir a un método que nos pueda aclarar la identidad de las sustancias; por ejemplo, tanto glucosa como galactosa son azúcares presentes en una gran cantidad de antocianinas, tienen el mismo peso molecular por lo que a través de un espectro de masas es imposible diferenciarlos. En nuestro caso, la diferenciación fue posible gracias al análisis HPLC utilizando extractos concentrados de antocianinas de variedades conocidas y cuyos perfiles antocianínicos están bien establecidos, constituyendo este un método rápido, sencillo y barato de identificación.

## CONCLUSIONES:

1. El pigmento de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler presenta un contenido en antocianinas monoméricas de 7g/100g de frutos secos separados de las semillas, estando casi puras, pues las cantidades de otros componentes fenólicos son mínimas.
2. Las antocianinas identificadas por HPLC-MS/MS (espectro de masas tándem) y por comparación con el cromatograma del extracto concentrado de antocianinas de *Vaccinium myrtillus*, son: delphinidina-3-glucósido en un 23,43%, delphinidina-3-rutinósido en un 2,65%, cianidina-3-glucósido en un 10,16%, cianidina-3-rutinósido en un 3,75%, petunidina-3-glucósido en un 24,21%, petunidina-3-rutinósido en un 7,15%, peonidina-3-glucósido en un 1,12%, peonidina-3-rutinósido en un 0,94%, malvidina-3-glucósido en un 21,64% y malvidina-3-rutinósido en un 4,95%.
3. La caracterización de los frutos y el análisis bromatológico dieron los siguientes resultados: los frutos inmaduros tienen una longitud promedio de  $7,13 \pm 0,729$  mm y un peso promedio de  $0,0625 \pm 0,017$  g; los frutos maduros tienen una longitud promedio de  $7,05 \pm 0,355$  mm y un peso promedio de  $0,1025 \pm 0,016$  g; el color de los frutos secos es morado oscuro ( $L^* = 33,26$ ,  $a+0,19$ ,  $b-0,90$ ); el rango de pH del jugo de los frutos frescos varía entre 3,81 a 3,84, presentan contenido acuoso de 56,30%; contenido proteico de 0,94%; contenido en grasas de 0,52%; contenido en fibra de 7,40%, y contenido de carbohidratos de 39,96%.

## REFERENCIAS:

BRAKO, L. & ZARUCCHI, J. L.

1993 "Catalogue of the flowering plants and gymnoosperms of Peru". Vol. 45. Missouri Botanical Garden.

CAO, GUOHUA; MUCCITELLI, HELEN, U; SÁNCHEZ MORENO, Concepción; PRIOR, RONALD, L.

2001 "Anthocianins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: A pharmacokinetic study". In: The American Journal of clinical nutrition, 73(5): 920-962.

DEL CARPIO JIMÉNEZ, Carla

2006 Estudio del colorante de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler "Cheq'che", Tesis para optar al grado académico de Magister en Ciencias, Mención Química, Especialidad Productos Naturales. Escuela de Post Grado de la UNSAAC.

FEAKES, D.M; GIUSTI, M.M

2003 "Feasibility of the use of acylated anthocyanins to color low-acid dairy products", 2003 IFT Annual Meeting - Chicago.

GIUSTI, MM AND WROLSTAD, R.E.

1996 "Characterization of red radish anthocyanins". *J.Food Sci.* 61(2):322-326.

GIUSTI, M.M; RODRÍGUEZ-SAONA, L.E. and WROLSTAD, R. E.

1999a "Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non acylated Pelargonidin-based anthocyanins"; *J.Agric.Food Chem.*, 47, 4631- 4637.

GIUSTI, M.M; Luis RODRÍGUEZ SAONA, Luis E; GRIFFIN, Donald, WROLSTAD, Ronald E.

1999b "Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanins characterization" *J. Agric. Food Chem.* 47, 4657-4664.

HERNÁNDEZ GIL, R. y BAUTISTA, D.

2002 "Crecimiento y cambios bioquímicos durante el proceso de maduración de la mora (*Rubus glaucus* BENTH)". En: *Agronomía Tropical* 27(2): 225-233. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.

HONG, V. and WROLSTAD, R.E.

1986 "Cranberry juice composition". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69: 199-207.

HONG, V. and WROLSTAD, R.E.

1990 "Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins". *J. Agric. Food Chem.* 38: 708-715.

JIN - MING KONG, LIAN - SAI CHIA

2003 "Analysis and biological activities of anthocyanins". In: *Phytochemistry* 64, 923-933, Pergamon.

LOHACHOOMPOL, V; SRZEDNICKI, G; CRASKE, J.

2004 "The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing". *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004:5, 248-252.

LOCK DE UGAZ, Olga

1990 "Colorantes naturales", Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima.

MARKAKIS, P.

1982 "Anthocyanins as food additives". Ed., Academic Press, New York, 245-246.

MOZETIC, Branka; TREBSE, Polonca; HRIBAR, Janez

2002 Determination and Quantitation of anthocyanins and hydroxycinnamic acids in different cultivars of sweet cherries (*Prunus avium* L) from Nova Gorica region (Slovenia), *J. Food Technol. Biothechnol.* 40(3) 207-212.

REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA

2002 Suplemento 2.2. Segunda edición; 40-42.

REIN, Maarit

2005 "Copolymerization reactions and color stability of berry anthocyanins" (Academic Dissertation) EKT series 1331. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Helsinki.

WROLSTAD, Ronald E; ACREE, Terry E.

2001 "Current Protocols in food analytical chemistry", volumen 1; John Wiley and Sons Inc, F1.1.1-F1.3.9, New York.

XUEMING, L; GENSHENG, X; WEIDONG, C; YUJUAN, X; JIJUN, W.

2004 "Quantification and purification of mulberry anthocyanins with macroporous resins", Journal of Biomedicine and Biotechnology; 2004:5; 326-331.

YACOVLEFF AND HERRERA F.L.

1935 "El mundo vegetal de los antiguos peruanos", En: Revista del Museo Nacional, Tomo IV N° 1, 1er semestre, pág.501, Lima.

#### ANEXOS:

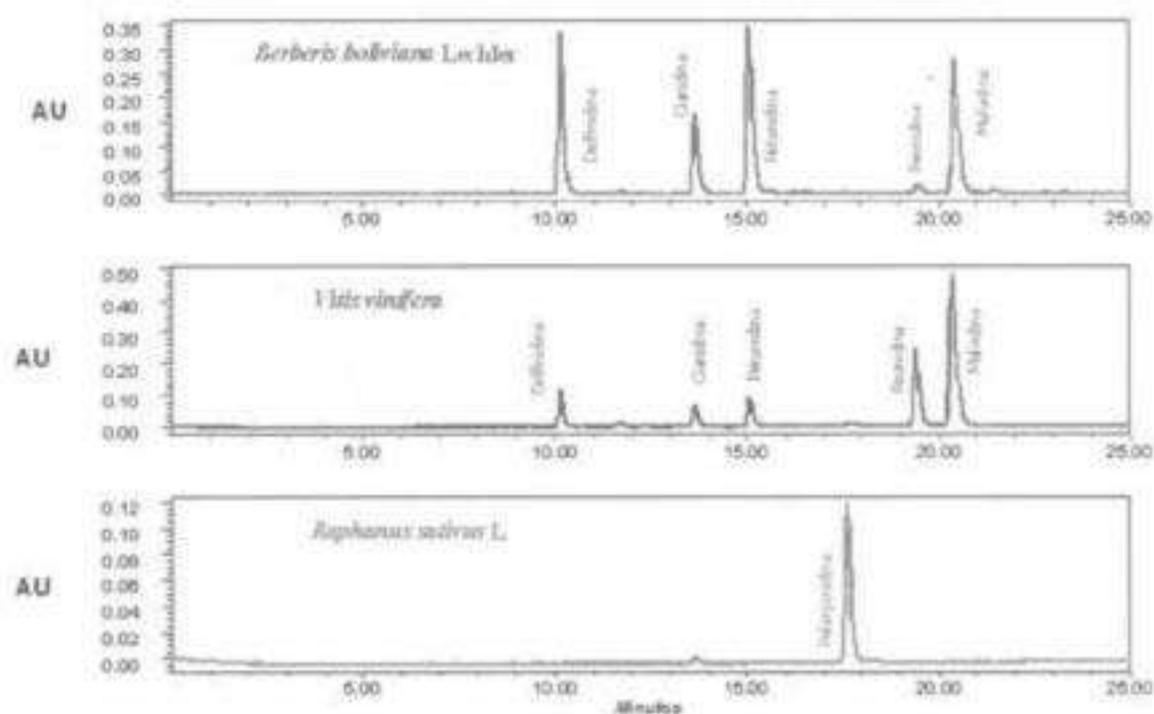


Figura N° 1. Cromatogramas de comparación obtenidas a 520nm de las especies *Berberis boliviana* Lechler, *Vitis vinifera* y *Raphanus sativus* L. Perfiles obtenidos luego de haber realizado la hidrólisis ácida correspondiente. En la especie *Vitis vinifera*, se encuentran 5 antocianidinas y en *Raphanus sativus* L. existe una sola antocianina. Solo las antocianidinas de *Vitis vinifera* están presentes en *Berberis boliviana* Lechler.

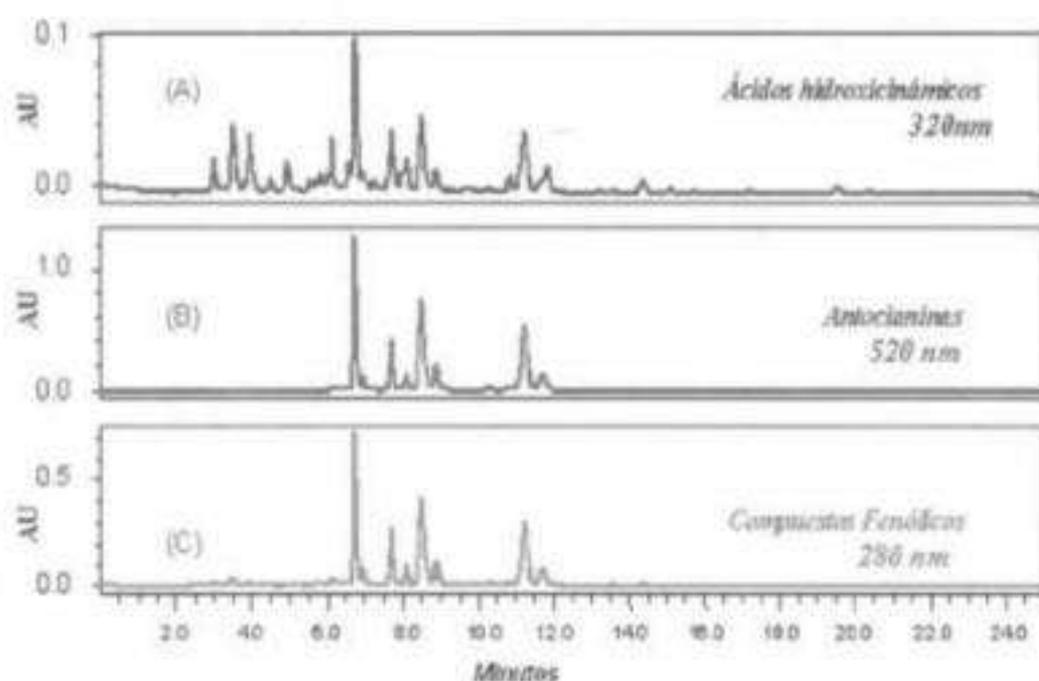


Figura Nº 2. Los Cromatogramas obtenidos a diferentes longitudes de onda, nos muestran que las antocianinas presentes en los frutos de *Berberis boliviana* Lechler, están casi puras, debido a que a 280nm (C), que es la longitud de onda a la cual se pueden identificar otros componentes fenólicos sólo aparecen las antocianinas, por lo que se puede considerar a estos frutos como una fuente casi pura de antocianinas.

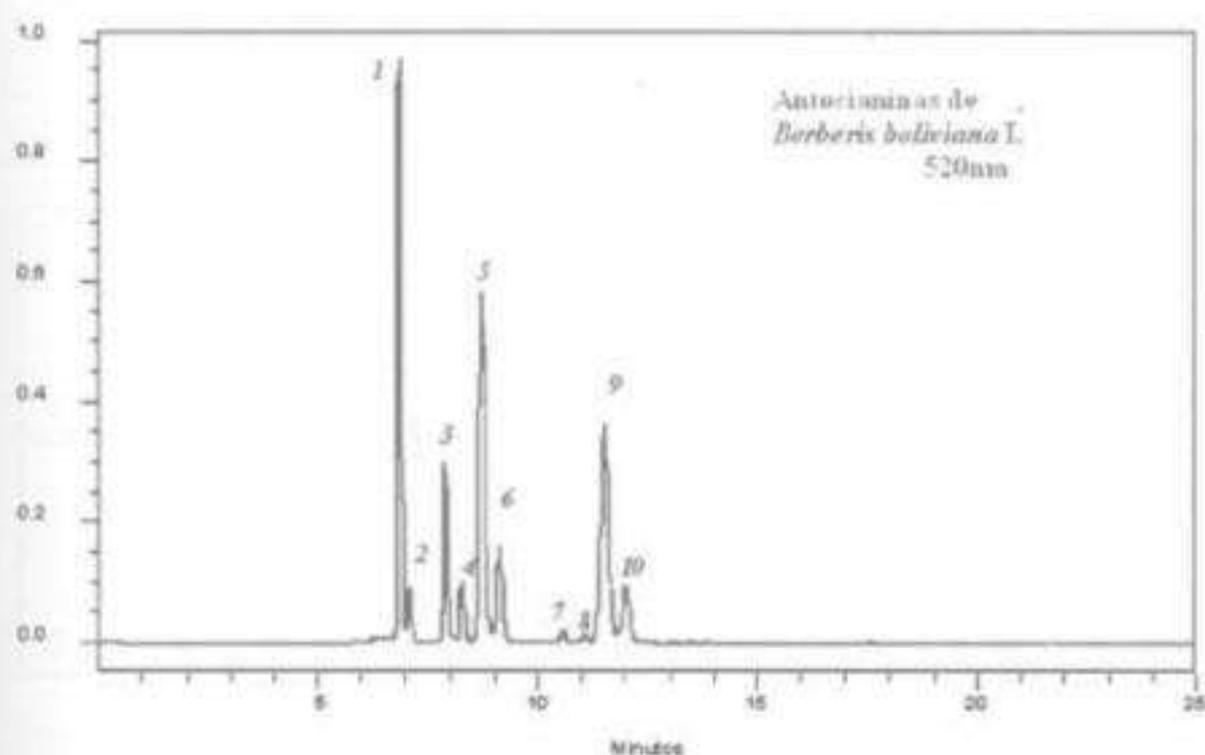


Figura Nº 3. Cromatogramas desarrollado en el equipo de HPLC, en el cual se observan 10 picos importantes, que representan a las 10 antocianinas presentes en *Berberis boliviana* Lechler.

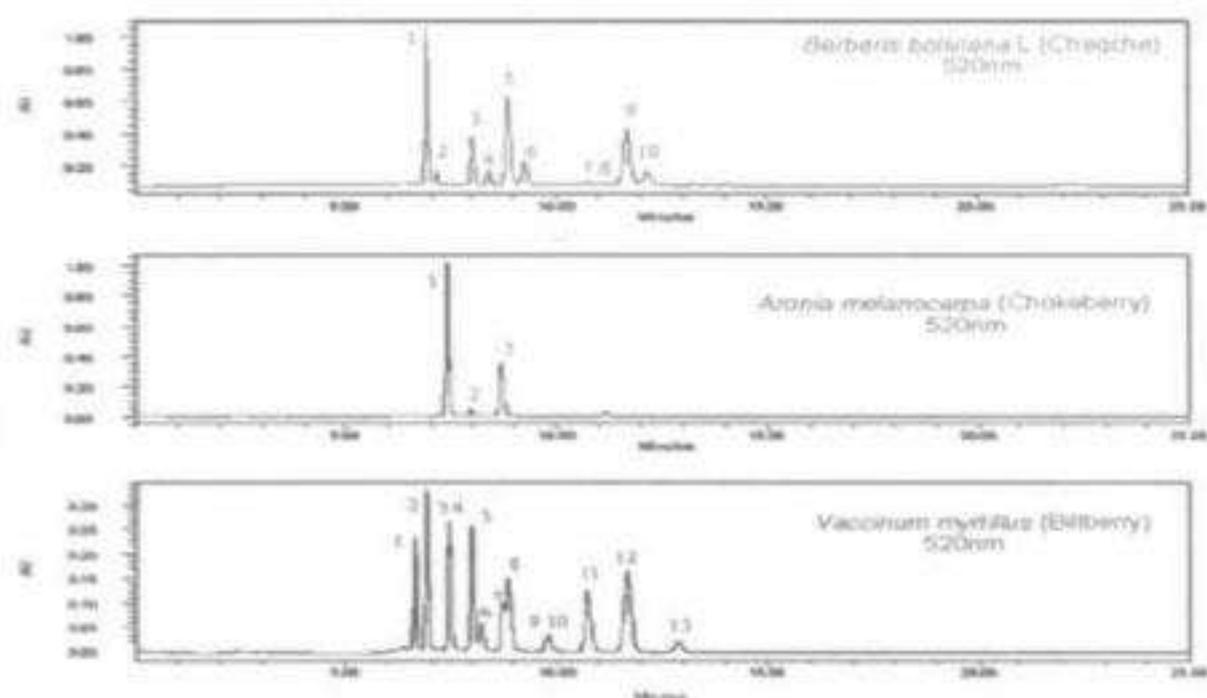


Figura Nº 4. Cromatogramas de comparación de las especies *Berberis boliviana* Lachler, *Aronia melanocarpa* y *Vaccinium Myrtillus* a 520nm.

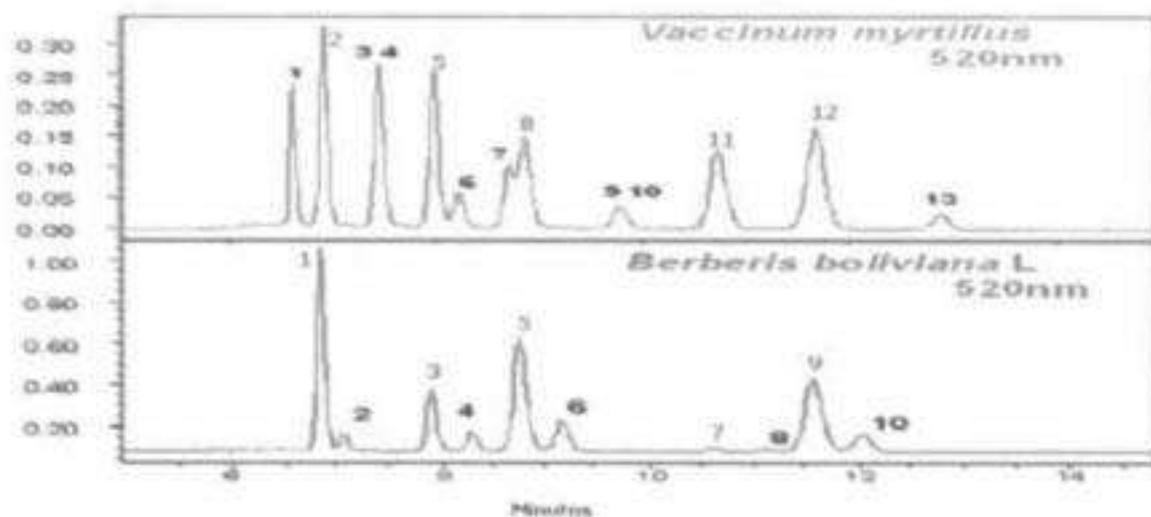


Figura Nº 5. Cromatogramas de comparación obtenidos a 520nm de las especies *Vaccinium myrtillus* (13 antocianinas, detalladas en la Tabla Nº 4.2) y *Berberis boliviana* Lachler (10 antocianinas). Perfiles obtenidos luego de haber realizado la correspondiente comita cromatográfica bajo las mismas condiciones de columna para ambas especies. La comparación sirvió para identificar el azúcar (glucosa) y la correspondiente antocianina en *Berberis boliviana* Lachler, como se muestra, los picos 1, 3, 5, 7 y 9 coinciden con los picos 2, 5, 8, 11 y 12 respectivamente.

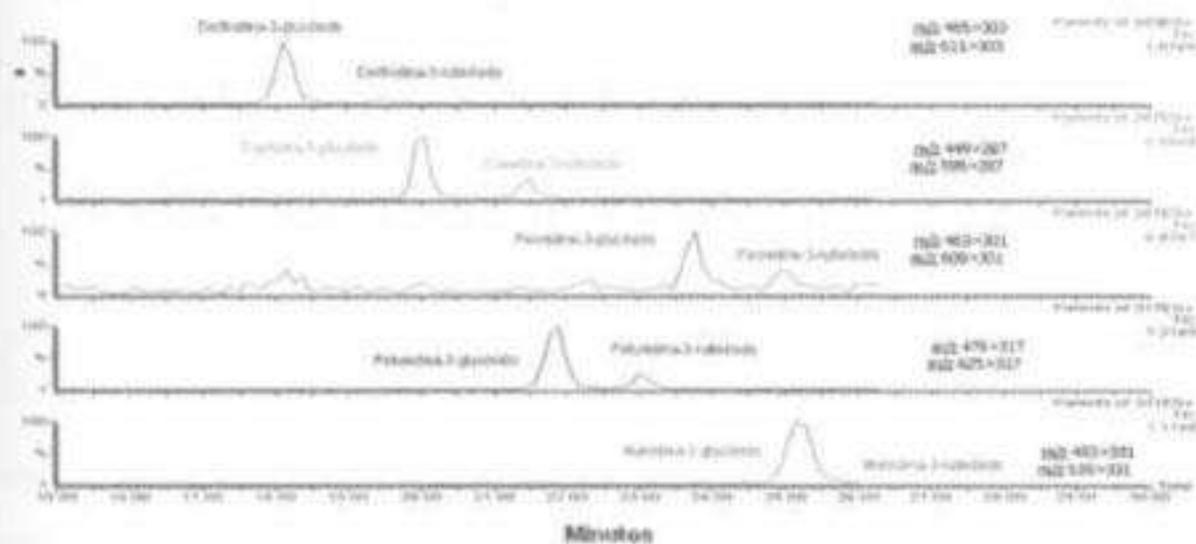


Figura Nº 6. LC-ESI/MS (Liquid chromatography-electro spray ionization - mass spectrometry) de las antocianinas presentes en el extracto de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler, usando la monitorización electiva de reacción (SMR).



*Cadena del Salkantay vista desde Phuyupatamarca - Santuario Histórico de Machupicchu*

*Foto: W. Galano Sánchez.*