

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI



Facultad de Enfermería y Nutrición



Licenciatura en Nutrición

Estabilidad gastrointestinal y bioactividad *in vitro* de antocianinas aisladas de zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino en función de la presencia de iones divalentes de hierro, zinc, magnesio y calcio.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN NUTRICIÓN

PRESENTA:

Vanessa Itzel Rosales Zárate

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Claudia Inés Victoria Campos

ASESORA DE TESIS: **Dra. María Judith Ríos Lugo**

ASESOR DE TESIS: **Dr. Jaime Reyes Hernández**

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

FEBRERO 2018

“Estabilidad gastrointestinal y bioactividad *in vitro* de antocianinas aisladas de zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino en función de la presencia de iones divalentes de hierro, zinc, magnesio y calcio”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN NUTRICIÓN

PRESENTA:

Vanessa Itzel Rosales Zárate

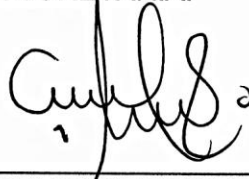
JURADO:

PRESIDENTA:



L. N. AIDA KARINA ARRIAGA SÁNCHEZ

SECRETARIA:



Q.F.B. ANA MARGARITA MARTINEZ VERASTEGUI MMC

VOCAL:



DRA. CLAUDIA INES VICTORIA CAMPOS

Febrero, 2018

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al apoyo financiero brindado por el Programa para el Desarrollo Profesional Docente (número DSA/103.5/16/10419). Así mismo agradezco la beca que me fue otorgada para la realización de tesis dentro del mismo proyecto.

Agradezco a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por abrirme las puertas para formarme profesionalmente. A la Facultad de Enfermería y Nutrición por haberme brindado la oportunidad de estudiar dentro de sus instalaciones. Así como a cada uno de los docentes de mi licenciatura que fueron vitales para guíarme durante mi carrera profesional. En especial a mi directora de tesis la Dra. Claudia Inés Victoria Campos por sembrar en mí el interés por la investigación y su enorme apoyo para el desarrollo de este trabajo.

También quiero agradecer al Instituto de Investigación de Zonas Desertéticas y a la Dra. Bertha Irene Juárez Flores por la confianza brindada para la realización de una parte del trabajo experimental dentro de las instalaciones de su laboratorio. Además agradezco mucho a la MC. Evelyn Regalado Rentería y a la QFB. María Eugenia Reyna Ortega por su apoyo técnico y compañía durante mi estancia en el Instituto. Así como al Dr. Jaime Reyes Hernández por su apoyo al brindarnos un espacio para trabajar la segunda parte del experimento dentro de su laboratorio en la Facultad de Enfermería y Nutrición.

Igualmente al Dr. Elhadi Yahia Kazuz del laboratorio de fitoquímicos y nutrición de la Universidad Autónoma de Querétaro y al Dr. José de Jesús Ornelas Paz del laboratorio de fitoquímicos y nutrientes del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Y al Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina por brindarnos un espacio para trabajar dentro sus instalaciones.

DEDICATORIAS

Agradezco a la vida por haberme puesto en el momento adecuado y con las personas indicadas para mí, ya que gracias a los tropiezos que he tenido durante mis años de vida me han llevado a comprender diversas situaciones para formar la persona que soy ahora y tener las oportunidades que nunca hubiera imaginado tener.

Sin parecer egocéntrica me dedico este trabajo por demostrarme las habilidades y destrezas que puedo llegar a desarrollar con muchísimo esfuerzo y dedicación, aunque se que aún me falta por aprender muchas cosas más, se que puedo dar mejores resultados. Por creer en mí, ya que si no creyera en la capacidad que tengo de realizar lo que me proponga ya me hubiese rendido antes.

Dedico este trabajo con todo mi corazón a mi hijo que fue mi motor principal desde que llego a mi vida y mi motivo para no darme por vencida y lograr el primero de tantos sueños. También a mi esposo por tratar de apoyarme y comprenderme en todo lo que estuvo a su alcance a lo largo de mi formación profesional, por su infinita paciencia y amor.

Además de mis familiares que fueron indispensables para que yo pudiera el día de hoy culminar mis estudios para obtener el grado de licenciada en nutrición y de alguna u otra manera me alentaron, incluyendo a toda la familia de parte de mi esposo, Familia Torres Marceleño, gracias de todo corazón.

Y a mis amigas por su gran apoyo incondicional, por todos los momentos que fueron de risas y estrés durante nuestra estancia en la universidad, sobre todo desde que llegó Mati a mi vida. También quisiera agradecer el apoyo que me ha brindado la Familia Picazo, desde que inicie de mis mejores amistades con Arantxa Picazo, muchísimas gracias. Además de a Lizzeth Huerta por lo ameno que me la pase y por todo los momentos que compartimos en el laboratorio trabajando.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE CUADROS	viii
RESUMEN	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Definición de Antocianinas	2
2.2 Fuentes Comestibles de las Antocianinas	3
2.3 Uso y Obtención de Extractos de Antocianinas	7
2.4 Biodisponibilidad.....	10
2.4.1 Digestión, Absorción y Metabolismo	12
2.5 Efectos en la Salud de las Antocianinas.....	22
2.5.1 Cáncer	23
2.5.2 Obesidad	25
2.5.3 Enfermedades Neuronales.....	26
2.5.4 Diabetes	26
2.5.5 Enfermedades Cardiovasculares	27
2.5.6 Enfermedades Pulmonares.....	28
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. HIPÓTESIS	31
5. OBJETIVOS.....	32
5.1 Objetivo General	32
5.2 Objetivos Específicos.....	32
6. MATERIAL Y MÉTODOS	33
6.1 Tipo de Estudio	33
6.2 Diseño del Estudio.....	33
6.3 Reactivos y Materia Vegetal.....	34
6.4 Extracción de Antocianinas	34
6.5 Aislamiento de extractos de Antocianinas.....	35
6.6 Digestion <i>in vitro</i>	36
6.7 Estabilidad Gastrointestinal de Compuestos Fenólicos Totales.....	39
6.8 Estabilidad Gastrointestinal de Antocianinas Totales	40

6.9 Estimación de la Actividad Antioxidante	41
6.9.1 Prueba FRAP	41
6.9.2 Prueba DPPH	42
6.10 Análisis Estadístico	42
6.11 Variables	43
6.11.1 Variables Dependientes	43
6.11.2 Variables independientes	43
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
7.1 Extracción de Antocianinas	44
7.3 Aislamiento de Extractos Ricos en Antocianinas	46
7.4 Estabilidad Gastrointestinal de Compuestos Fenólicos Totales	51
7.5 Estabilidad Gastrointestinal de Antocianinas Totales	53
7.6 Estimación de la Actividad Antioxidante	57
7.5.1 FRAP	59
7.5.2 DPPH	62
8. CONCLUSIONES	65
9. BIBLIOGRAFÍA	66

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química base de las antocianidinas.....	2
2	Estructura de las antocianidinas relacionadas a diferentes niveles de pH.....	3
3	Estructura química de fase sólida Amberlite XAD-7.....	9
4	Estructura química de hidrogel Sephadex LH20.....	10
5	Proceso de digestión, metabolismo y absorción de las antocianinas.....	18
6	Procedimiento de extracción y aislamiento de antocianinas a partir de diferentes frutas (zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino)	37
7	Procedimiento de digestión <i>in vitro</i> empleado en este estudio.....	39
8	Espectros de absorción de lavados de etil acetato en el proceso de extracción de antocianinas a partir de frutos de zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino	45
9	Gráfica de elución de antocianinas de la columna Amberlite XAD-7 a partir de extractos de diferentes matrices frutales.....	48
10	Espectros de absorción de antocianinas eludidas después de Amberlite XAD-7 y Sephadex LH-20 a partir de diferentes matrices frutales (zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino)....	49
11	Gráfica de elución de antocianinas de la columna Sephadex LH-20 a partir de diferentes matrices frutales.....	50
12	Estabilidad gástrica y gastrointestinal <i>in vitro</i> del contenido fenólico presente en los extractos de digestión gástrica y gastrointestinal de las antocianinas de zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino en presencia y ausencia de iones divalentes (hierro, zinc, magnesio y calcio).....	54
13	Estabilidad gástrica y gastrointestinal <i>in vitro</i> de antocianinas de zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino en presencia y ausencia de iones divalentes (hierro, zinc, magnesio y calcio).....	57
14	Capacidad antioxidante de antocianinas aisladas estimada por la prueba FRAP a partir de diferentes matrices frutales (zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino) sometidas a diferentes tratamientos con y sin iones divalentes de hierro, zinc, magnesio y calcio durante el proceso de digestión <i>in vitro</i> ...	60
15	Capacidad antioxidante de antocianinas aisladas estimada por la prueba DPPH a partir de diferentes matrices frutales (zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino) sometidas a diferentes tratamientos con y sin iones divalentes de hierro, zinc, magnesio y calcio después de un proceso de digestión gástrico y gastrointestinal <i>in vitro</i>	63

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Contenido de antocianinas en diferentes matrices frutales.....	6

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar por primera vez la estabilidad gastrointestinal y bioactividad *in vitro* de antocianinas con diferente estructura química en función de la presencia de iones divalentes (hierro, zinc, magnesio y calcio). Se aislaron antocianinas de diferentes fuentes frutales (zarzamora, fresa y cáscaras de uva de vino) y se sometieron a un proceso de digestión *in vitro* que incluía las fases gástrica y gastrointestinal. Los resultados indican que las antocianinas de zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino fueron estables en el medio gástrico (70.8 a 143.5 %). Sin embargo, al digerirse con iones las antocianinas de zarzamora y fresa no mostraron diferencias significativas en su estabilidad. Mientras que las antocianinas de cáscara de uva de vino al digerirse con zinc y magnesio fueron 30.7 a 42.8 % más estables. La estabilidad gastrointestinal de las antocianinas varió de 28.6 a 85.7%. Todos los iones favorecieron la estabilidad las antocianinas de zarzamora (4.7 - 21.0 % más), el hierro favoreció las antocianinas de fresa (21.9 % más) y el magnesio y el calcio favorecieron las antocianinas de cáscara de uva de vino (21.7 - 38.9 % más). La variación de la actividad antioxidante se correlacionó positivamente con el contenido de antocianinas ($r^2 = 0.3885 - 0.8106$) y negativamente con el contenido de compuestos fenólicos totales ($r^2 = 0.1035 - 0.4618$). Estos resultados sugieren que los iones tienen un efecto estabilizador diferencial para cada antocianinas en el medio gastrointestinal y en función de ello varía su actividad antioxidante.

Palabras clave: antocianinas, estabilidad gastrointestinal, iones, purificación, actividad antioxidante.

1. INTRODUCCIÓN

Los frutos rojos son la principal fuente de antocianinas para los humanos (Wu *et al.*, 2006). Las antocianinas son pigmentos solubles en agua presentes en los tejidos vegetales que proporcionan una coloración azul, púrpura y roja (Andrés-Lacueva *et al.*, 2010; Frøytlog *et al.*, 1998; Prior, 2012; Yang *et al.*, 2011). Dentro de sus funciones básicas se encuentra proteger los tejidos vegetales de la saturación de luz y del daño oxidativo y proporcionar color como mecanismo de atracción y defensa frente a dispersores y depredadores de las semillas, respectivamente (Jones, 2007; Steyn, 2009; Wu *et al.*, 2006). Pero se han observado efectos positivos en la salud humana debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Asada *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2012; Fossen *et al.*, 1998; Mateus y Freitas, 2009; Phippen y Simon *et al.*, 1998; Scordino *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2011). Por ello el estudio de estos mecanismos de acción han tomado gran importancia ya que previenen el retraso o inicio de las enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad, enfermedades pulmonares y neuronales (Basu *et al.*, 2010; Cassidy *et al.*, 2015; Guo y Ling, 2015; Liobikas *et al.*, 2016; Metha *et al.*, 2016; Mink *et al.*, 2007; Prior y Wu, 2006; Wallace *et al.*, 2011; Zafra-Stone *et al.*, 2007). Y un área de interés es el estudio de su biodisponibilidad. La biodisponibilidad se ha definido como aquellos componentes de un alimento que se digieren, absorben, metabolizan y excretan a través del tracto gastrointestinal. Mientras que la bioaccesibilidad es la fracción de compuestos bioactivos que son estables a la digestión gastrointestinal. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar por primera vez la estabilidad gastrointestinal y bioactividad *in vitro* de antocianinas con diferente estructura química en función de la presencia de iones divalentes (hierro, zinc, magnesio y calcio).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Definición de Antocianinas

Las antocianinas son pigmentos azules, púrpura y rojos solubles en agua presentes en tejidos vegetales (Andrés-Lacueva *et al.*, 2010; Frøytlog *et al.*, 1998; Prior, 2012; Yang *et al.*, 2011). Esta coloración es originada por el cromóforo antocianidina, forma no glicosilada, representada en la Figura 1 (He y Giusti, 2010; Prior, 2012; Wallace, 2011). Las antocianidinas más comunes en la naturaleza son: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina. Estas difieren en los grupos funcionales que se encuentran en la posición R1 y R2 de la estructura central (Andrés-Lacueva *et al.*, 2010; Pierson *et al.*, 2012; Prior, 2012). En la naturaleza las antocianidinas siempre se encuentran unidas a uno o más azúcares, es decir, como antocianinas. Los azúcares (glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa) normalmente se unen en la posición 3 del anillo C o en la posición 5 ó 7 del anillo A (Andrés-Lacueva *et al.*, 2010; Prior, 2012; Yang *et al.*, 2011).

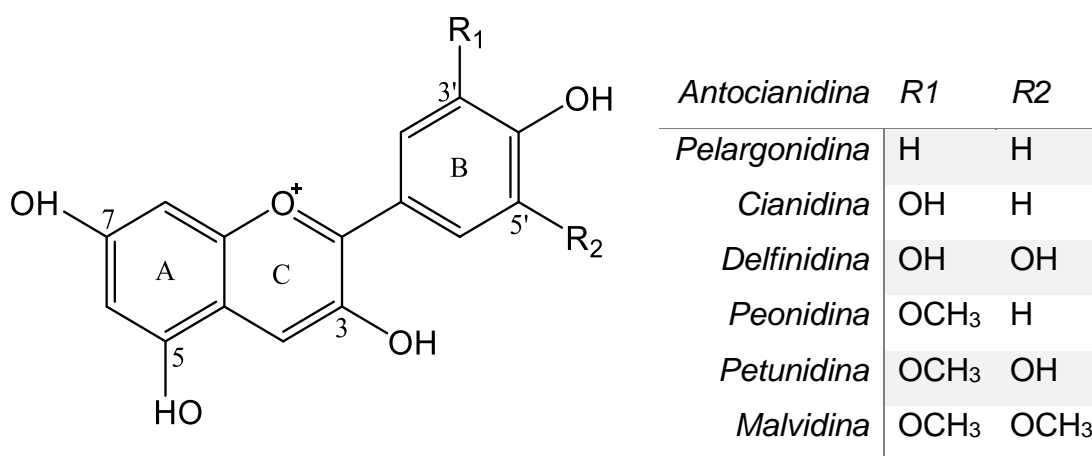


Figura 1. Estructura química base de las antocianidinas (Tomado de Prior, 2012)

Los colores de las antocianinas varían por la acidez o alcalinidad que posea el medio donde estén presentes. También son afectadas por la temperatura,

exposición a la luz, pH, enzimas, oxígeno, iones metálicos, solventes y el tipo de antocianidinas (Fernandes *et al.*, 2013; Marçó *et al.*, 2010; McGhie y Walton, 2007; Yang *et al.*, 2011). La intensidad del color incrementa en medios alcalinos, pero el color y la longitud de onda máxima característicos de cada antocianidina se presentan en condiciones ácidas (pH <2) (Figura 2). Mientras que en pH neutro pierden su color. Las antocianidinas son parte de la familia de los flavonoides y están basadas estructuralmente en el catión flavilio (predominante en pH <2). El catión flavilio tiene una estructura característica de carbonos C₃-C₆-C₃ que permite la glicosilación. Esto quiere decir, que a esta base se remueven iones de hidrógeno para formar una base quinoidal y una pseudo-base carbinol a condiciones alcalinas. El carbinol es una base incolora porque no absorbe luz visible, que permite la migración de grupos o átomos para formar *cis*-chalconas. Las *cis*-chalconas por medio de un proceso de isomerización dan lugar a *trans*-chalconas y mediante el mismo proceso puede regresar a su forma original, estas estructuras de las antocianinas constituyen la forma más abundante en medios neutros (Marçó *et al.*, 2010; Wallace, 2011).

2.2 Fuentes Comestibles de las Antocianinas

Las antocianinas se encuentran mayormente en los cloroplastos de la cáscara de frutas, pero también se pueden encontrar en la pulpa. Su principal función es proteger los tejidos vegetales de la saturación de luz y del daño oxidativo. También proporcionan color como mecanismo de atracción y defensa frente a dispersores y depredadores de las semillas, respectivamente (Jones, 2007; Steyn, 2009; Wu *et al.*, 2006). Además en contenido de estos compuestos es un indicador de calidad de las frutas. La síntesis de antocianinas se regula por factores endógenos y ambientales. El tamaño de la fruta influirá en la concentración de las antocianinas, por lo que a menor tamaño mayor concentración y viceversa. La capacidad absorbente de luz de cada fruta dará una variabilidad en el color. De esta manera cuando la fruta capta toda la luz se

tornará negra. El color en cada fruto incrementará de forma individual debido a la posición en la que se encuentre dentro de la planta (Steyn, 2009). Las antocianinas se degradan en ausencia de luz o a temperaturas cálidas. Sin embargo, a temperaturas bajas se ha visto que aumenta la producción de antocianinas en frutas como manzana, pera, uva, zarzamora y arándano antes de su cosecha y/o almacenamiento. Y cuando el clima varía entre cálido y frío el color de algunas peras se ha visto entre rojo y verde. Por otro lado, la ausencia de nitrógeno en el suelo favorece la concentración de antocianinas porque es una unidad base de la clorofila y el ciclo del carbono en la fotosíntesis. Esto ocasiona una acumulación de hidratos de carbono y un decremento de la clorofila permitiendo el cambio de coloración en la madurez de las frutas (Steyn, 2009).

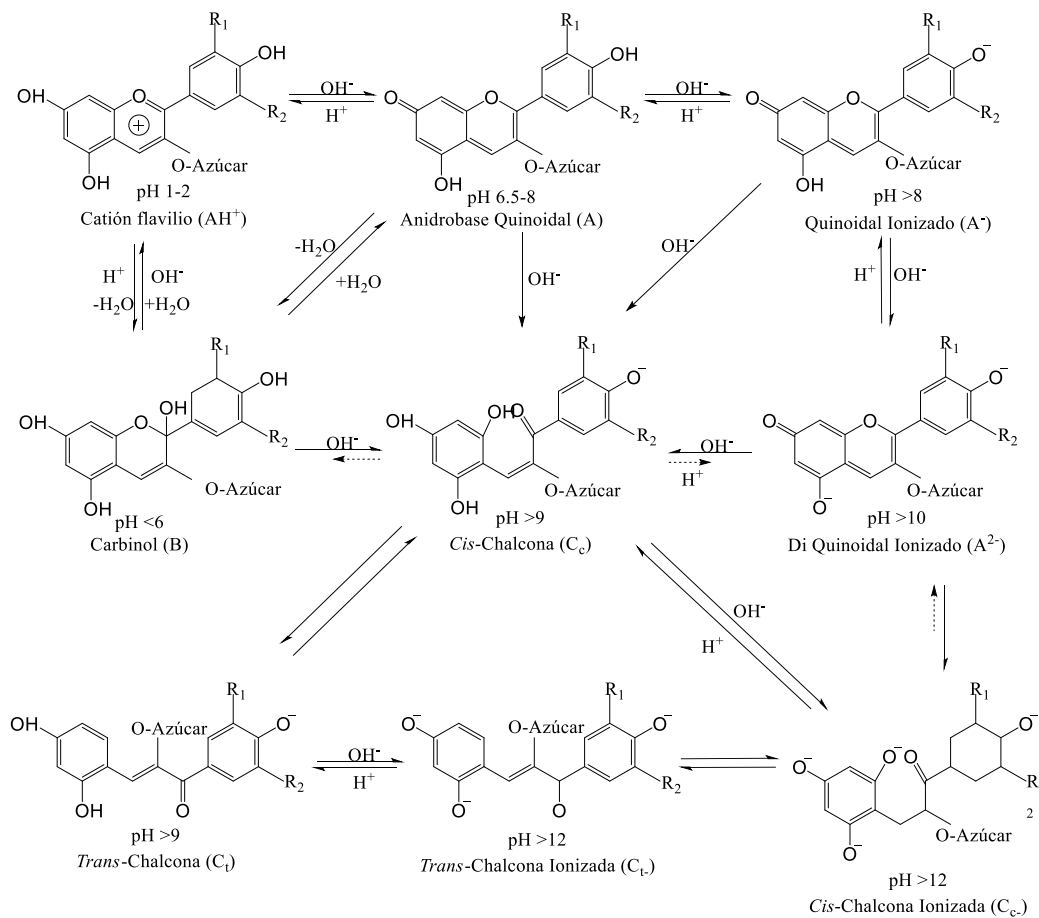


Figura 2. Estructura de las antocianidinas relacionadas a diferentes niveles de pH. (Tomado de Marçõ *et al.*, 2011)

Los frutos rojos, anaranjados, azules y morados son la principal fuente de antocianinas para los humanos (Cuadro 1). En Estados Unidos de América (E.U.A.) el consumo estimado de antocianinas es de 12.5 mg al día por persona (Selma *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2006). La ingesta de antocianinas en población alemana se estimó entre 0 a 76 mg al día por persona (Wu *et al.*, 2006). Mientras que en adultos finlandeses la ingesta media de polifenoles se estimó de 863 ± 415 mg al día (Ovaskainen, *et al.*, 2008). La ingesta diaria de antocianinas puede variar por la influencia de factores geográficos, culturales y económicos. Se puede ingerir entre >100 mg hasta 200 mg de antocianinas al día seleccionando alimentos con alta concentración de pigmentos (frutas y bayas) (Selma *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2006). La temporalidad de las frutas es un obstáculo para el consumo constante. Aunque, el almacenamiento congelado permite el acceso de frutas con alta concentración de antocianinas a lo largo del año (Wu *et al.*, 2006).

Las principales fuentes de antocianinas específicas se describen a continuación. La cianidina es la antocianidina más abundante en los alimentos y sus concentraciones más altas se encuentran en las zarzamoras (Steyn, 2009; Wu *et al.*, 2006). La principal fuente de delphinidina son las bayas negras. Las antocianidinas como petunidina y la malvidina fueron reportadas primeramente en moras cultivadas y silvestres. Y concentraciones elevadas de peonidina y pelargonidina fueron encontradas en cerezas y uvas y rábanos respectivamente (Wu *et al.*, 2006).

Cuadro 1. Contenido de antocianinas en diferentes matrices frutales

Fuente	Cereza ^{1**} (<i>Courmuis mas</i>)	Mora azul ² (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	Manzana ³ (<i>Malus domestica</i>)	Granada ⁴ (<i>Punica granatum</i>)	Uva ⁵ (<i>Vitis vinifera</i>)	Uva de vino tinto ⁶ (<i>Vitis vinifera</i>)	Fresa ⁶ (<i>Fragaria x ananassa</i>)	Ciruela ⁷ (<i>Prunus domestica</i>)	Higo ⁸ (<i>Ficus carica</i>)	Arándano rojo ⁹ (<i>Vaccinium macrocarpon</i>)	Arándano negro ⁹ (<i>Aronia melanocarpa</i>)	Lichi ¹⁰ (<i>Litchi chinensis</i>)	Grosella negra ^{2,11} (<i>Ribes nigrum</i>)	Grosella roja ^{1,2} (<i>Ribes rubrum</i>)	Uva críspa ¹ (<i>Ribes gossuliana</i>)	Frambuesa roja ¹ (<i>Rubus idaeus</i>)	Col morada ¹² (<i>Brassica oleracea</i>)	Coliflor morada ¹² (<i>Brassica oleracea var capitata</i>)	Zarzamora ¹ (<i>Rubus fruticosus</i>)	Maíz azul ¹³ (<i>Zea mays</i>)
Cia-3-glc*	100	-	100	11	16	-	4	17	9	1	-	15	-	33	100	99	-	-	100	85
Cia-3-rut	-	-	-	-	-	-	-	79	89	-	-	70	-	-	-	-	-	-	-	-
Cia-3-O-rut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	38	12	-	-	-	-	-	-
Cia-3(6-p-cou)-sof-5-glc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29	17	-	-
Cia-3(6-cou)-sof-5(6-sin)-glc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35	32	-	-
Cia-3(6-fer)-sof-5-glc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	13	-	-
Cia-3(6-fer)-sof-5(6-sin)-glc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	23	-	-
Cia-3-gal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cia-3-ara	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	44	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cia-3-O-(2-xilosulrutinosido)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	46	-	-	-	-	-	-
Pg-3-glc	-	-	-	-	-	-	73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
Pg-3-malonil-glc	-	-	-	-	-	-	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pg-3,5-di-O-glc	-	-	-	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Del-3-glc	-	1	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Del-3-O-glc	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-
Del-3-O-rut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45	-	-	-	-	-	-	-
Pn-3-glc	-	-	-	-	39	-	-	2	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pn-3-gal	-	1	-	-	-	-	-	-	-	42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mlv-3-glc	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-
Mlv-3-O-gal	-	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mlv-3-O-glc	-	5	-	-	-	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total (mg / 100g de fruto fresco)	223	65.2	14.4	48.6	12.2	1700	37.2	43.8	58.3	49.8	316.7	24.9	171.6	22.9	43.3	42.8	3.2	10.1	138.9	37.8

*Abreviaciones utilizadas: Cia, Cianidina; Glc, glucosido; Rut, rutinosido; Cou, coumaril; Sof, sofrorosido; Sin, sinafil; Fer, ferol; Gal, galactosido; Ara, arabinosa; Pg, pelargonidina; Del, delphinidina; Pn, peonidina; Mvl, malvidina.

**Referencias: 1 Pantelidis et al., 2007; 2 Gavrilova et al., 2011; 3 Wolfe et al., 2003; 4 Sengul et al., 2014; 5 Cantos et al., 2002; 6 Shi et al., 2016; 7 Chun et al., 2003; 8 Bey et al., 2016; Dueñas et al., 2008; Solomon et al., 2006; 9 Zheng y Wang, 2003; 10 Pierson et al., 2012; Rivera et al., 1999; 11 Wu et al., 2006 12 Scalzo, 2008; 13 Abdel et al., 2006; Escalante et al., 2013.

2.3 Uso y Obtención de Extractos de Antocianinas

Las antocianinas se han utilizado como colorantes naturales seguros y efectivos en alimentos y bebidas. (Asada *et al.*, 2014; Chandra *et al.*, 1993; Kamonpatana *et al.*, 2012; Schwarz *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011). Se comenzaron a utilizar desde los años 90's. En los últimos años su uso disminuyó debido a los efectos adversos a la salud que presentan los colorantes sintéticos, como el colorante Rojo No. 40 (Rojo Allura) (Chandra *et al.*, 2001; He y Giusti, 2011; Kamonpatana *et al.*, 2012; Mateus y Freitas, 2009). Estos compuestos son importantes para la industria alimentaria debido a que el color es la principal característica de calidad para los consumidores. Y su aceptabilidad se refleja en el crecimiento comercial ante la competencia mercantil. Por ello, para seguir atrayendo a los consumidores (particularmente jóvenes) es importante desarrollar nuevos productos que además desacuerden con la relación sabor-color (Mateus y Freitas, 2009).

Las antocianinas, además de ser un aditivo alimenticio para productos procesados como jugos, vinos, mermeladas, productos confinados, productos lácteos, productos de pastelería, etc. Se ha observado efectos positivos en la salud humana debido a su propiedad antioxidante y falta de toxicidad (Asada *et al.*, 2014 ; Chang *et al.*, 2012; Fossen *et al.*, 1998; Mateus y Freitas, 2009; Phippen y Simon *et al.*, 1998; Scordino *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2011). Estas características son de gran interés para las áreas de nutrición, medicina y farmacología, porque son utilizadas en el mejoramiento de los tratamientos de enfermedades crónicas (Asada *et al.*, 2014; Buran *et al.*, 2014; Cabrita y Anderson, 1999; Chang *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2005; Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010; He and Giusti, 2011; Schwarz, 2003; Scordino *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2011).

Sin embargo, debido a su inestabilidad química se han estudiado poco actualmente. Además de que se encuentran mezcladas con otros compuestos dentro de la matriz alimentaria que dificultan la evaluación de las propiedades que se les atribuye (He y Giusti, 2011; Wang *et al.*, 2014). Los métodos comúnmente utilizados para extraer las antocianinas son, cromatografía en columna (CC), extracción de fase sólida (SPE), cromatografía en contra corriente (HSCCC), cromatografía preparativa líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en columna, cromatografía líquida de baja presión (LPLC) y cromatografía de capa fina (TLC) (Asada *et al.*, 2014; Buran *et al.*, 2014; Byamukama *et al.*, 2005; Cabrita y Anderson, 1999; Chandra *et al.*, 1993; Chandra *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2012; Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010; Ferreres *et al.*, 1997; Fossen *et al.*, 2004; Frøytlog *et al.*, 1998; He y Giusti, 2011; Juadjur y Winterhaltr *et al.*, 2012; Kammerer *et al.*, 2005; Kamonpatana *et al.*, 2012; Pérez-Magariño *et al.*, 2008; Phippen y Simon, 1998; Rayyan *et al.*, 2005; Riihinen *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2004; Scordino *et al.*, 2004; Stobiecki y Kachlicki, 2006; Tsai *et al.*, 2002; Schwarz *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2011). Las limitaciones que se encuentran en algunos de estos procesos son la necesidad de equipo especializado, las condiciones de operación por el uso de material tóxico y altos costos en producción industrial. Además de que no hay una eliminación completa de los residuos de disolventes orgánicos miscibles lo cual constituye riesgos a la salud (Wang *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2011).

La tecnología de separación en fase sólida por medio de resinas sintéticas se basan en la absorción de compuestos en soluciones acuosas por la propiedad hidrofóbica y apilación aromática. Debido a esto se usan con el propósito de concentrar compuestos fenólicos y remover los azúcares, hidratos de carbono y aminoácidos (Buran *et al.*, 2014; Kammerer *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2015). Por lo que en algunos ensayos han propuesto a las resinas de Amberlite XAD-7 y Sephadex LH-20 como ideales para la separaciones de fenoles debido a su

estructura química que también permite que se regeneren fácilmente y son relativamente de bajo costo (Yao *et al.*, 2015). La resina polimérica tipo Amberlite XAD-7 posee propiedades acrílicas, alifáticas y una amplia y uniforme área absorbente. Su funcionamiento se basa en el principio de que “lo similar atrae lo similar”, es decir, que absorbe compuestos con estructura química similar. Se ha aplicado en la remoción de compuestos relativamente polares de extractos no acuosos, remoción de compuestos no aromáticos de extractos polares, recuperación de extractos vegetales, recuperación de antibióticos, enzimas y proteínas, remoción de contaminantes orgánicos de desechos acuosos, corrientes de vapor e inmovilización enzimática (Figura 3). La resina Shepadox LH-20 es un medio poroso que separa compuestos por especificidad (tamaño, hidrofobicidad, carga, afinidad cromatográfica y puntos isoeléctricos). Además de ser ventajoso para moléculas con sensibilidad a cambios como pH, concentración de iones metálicos y condiciones ambientales que dan inestabilidad a los compuestos (Figura 4) (Riihinen *et al.*, 2012; Rohm y Haas, 2006).

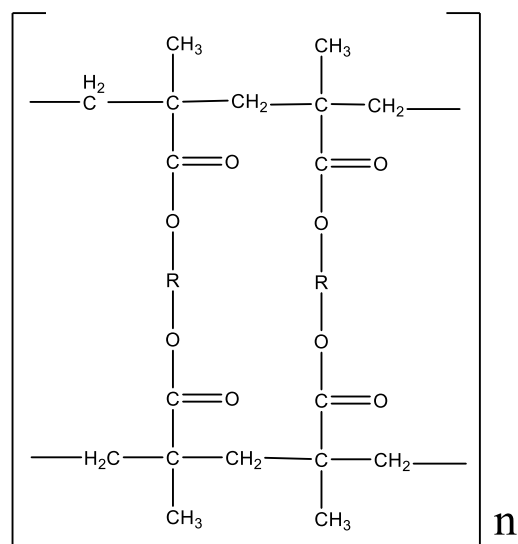


Figura 3. Estructura química de fase sólida Amberlite XAD-7 (Tomado de Domínguez *et al.*, 2011)

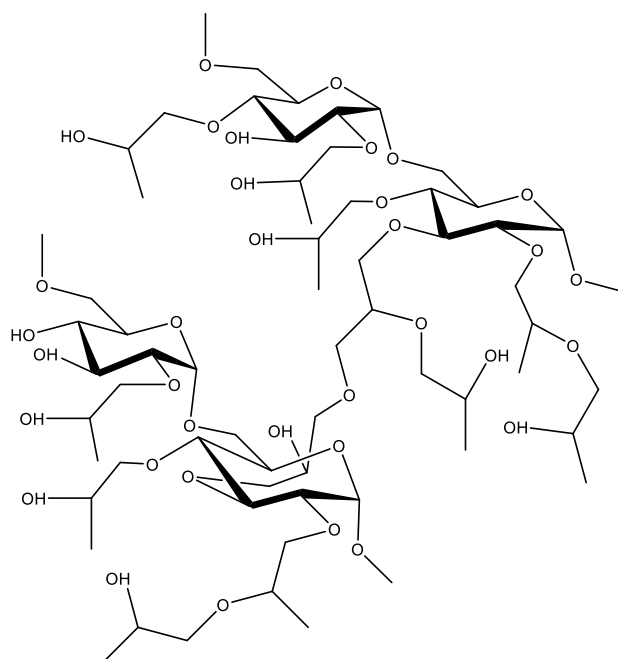


Figura 4. Estructura química de hidrogel Sephadex LH- 20 (Tomado de GE Healthcare, 2007)

2.4 Biodisponibilidad

El estudio de las antocianinas va en aumento debido a los beneficios que ofrece a la salud por sus propiedades físico-químicas (McGhie y Walton, 2007). Un área de interés es el estudio de su biodisponibilidad. La biodisponibilidad se ha definido como aquellos componentes de un alimento que se digieren, absorben, metabolizan y excretan a través del tracto gastrointestinal. Mientras que la bioaccesibilidad es la fracción de compuestos bioactivos que son estables a la digestión gastrointestinal. Por lo tanto, los estudios de biodisponibilidad de antocianinas tienen el objetivo de evaluar el grado de absorción para la formación de compuestos bioactivos (Manach *et al.*, 2005; McGhie y Walton, 2007). De la gran diversidad de polifenoles, las antocianinas entre otros compuestos, son las menos absorbidas. Por lo cual su baja biodisponibilidad se refleja en la excreción urinaria con valores de 0.004% a 0.1% (Kay, 2006; Manach *et al.*, 2005; McGhie

y Walton, 2007; Yang *et al.*, 2011). Los bajos niveles de absorción reportados hasta hoy, ponen en duda la actividad de las antocianinas en relación con los efectos a la salud que se les atribuye (McDougall *et al.*, 2005; McDougall *et al.*, 2007; Faria *et al.*, 2009). Probablemente la baja biodisponibilidad reportada se debe a que la metodología de extracción de antocianinas en tejidos no ha sido optimizada, provocando que algún metabolito importante no haya sido descubierto (Kay, 2006; Manach *et al.*, 2005).

Para evaluar el nivel de biodisponibilidad de antocianinas se ha llevado a cabo experimentación *in vivo* e *in vitro* (Kay, 2006; McDougall *et al.*, 2005; McGhie y Walton, 2007; Yang *et al.*, 2011). Los métodos de análisis *in vivo* calculan la máxima concentración en plasma y su excreción urinaria con previa ingesta de alimentos o extractos ricos en antocianinas (Kay, 2006; Manach *et al.*, 2005; McDougall *et al.*, 2005; McGhie y Walton, 2007; Yang *et al.*, 2011). Pero estos resultan ser experimentos complejos, caros y largos, además de tener implicaciones éticas (McDougall *et al.*, 2005; McGhie y Walton, 2007). Por tanto se han usado digestiones *in vitro* utilizando extractos frutales de antocianinas. Este tipo de metodología resulta ser simple, rápida, segura y actualizable (Liang *et al.*, 2012; McDougall *et al.*, 2005). Además de realizarse codigestiones (mezcla de algún alimento seco o húmedo más el extracto de antocianinas) para monitorear la estabilidad y recuperación individual de antocianinas usando Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detectores de Espectrometría de Masas (HPLC-MS). La HPLC-MS igualmente ha sido útil para la identificación de metabolitos como glucorónidos y sulfatos de antocianina en orina humana. Es importante seguir realizando investigaciones sobre la biodisponibilidad de las antocianinas debido a que interfieren varios factores (como la variedad de las matrices alimentarias, la composición misma de estas fuentes alimenticias, la estabilidad de las antocianinas durante el proceso digestivo, la características individuales de las diferentes antocianinas) que limitan el conocimiento sobre su potencial de absorción, y sus efectos positivos en la salud por su capacidad

antioxidante (Kay, 2006; Manach *et al.*, 2005; McGhie y Walton, 2007; Yang *et al.*, 2011).

2.4.1 Digestión, Absorción y Metabolismo

Después de ser consumidos los compuestos bioactivos viajan dentro del cuerpo hasta alcanzar un órgano o tejido en específico y causar algún efecto (McDougall *et al.*, 2005). Mediante el proceso digestivo las antocianinas se ven influenciadas por factores como el pH, enzimas y temperatura corporal (Figura 5) (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007; McDougall *et al.*, 2005, 2007; Stalmach *et al.*, 2012).

2.4.1.1 Boca

El proceso digestivo comienza desde la introducción del alimento a través de la boca. Por lo que las antocianinas al entrar en contacto con la saliva son parcialmente degradadas (alrededor de un 60%) debido a la temperatura (37 °C) y pH de 6.4 en un tiempo aproximado de una hora. En un estudio *ex vivo* se observó que la delfinidina y petunidina glucosiladas se degradaron más rápidamente que la cianidina, pelargonidina, malvidina y peonidina en condiciones orales. Las antocianinas conjugadas con di- o tri- sacáridos fueron más estables que con monosacáridos. Y se ha visto menor degradación cuando hay menor número de bacterias en la microbiota oral (Kamonpatana *et al.*, 2012). Los tejidos orales, la saliva y la microbiota oral potencializan el metabolismo intracelular de las antocianinas (Mallery *et al.*, 2011). En el epitelio superficial escamoso estratificado se encuentran enzimas como β -D-glucosidasa, β -D-galactosidasa y lactasa floridzin hidrolasa (LPH). Aunque también se ha encontrado β -D-glucosidasa y LPH en los conductos terminales de la glándula salivaria. Estas

enzimas influyen en la producción de metabolitos de cianidina glucosilada (Ácido Protocatecuico (PCA) y Aldehído Floroglucinol (PGA)) debido a la desglicolización de las antocianinas (Kamonpatana *et al.*, 2012; Mallery *et al.*, 2011). La prolina salival aumenta del 1% al 3% la recuperación de antocianinas en el epitelio oral debido a que enlaza los compuestos fenólicos cuando lúbrica los bolos alimenticios (Kamonpata *et al.*, 2012; Wiese *et al.*, 2008). La detección de antocianinas glucoronizadas derivadas de conjugados en saliva implica liberación de un metabolito estable capaz de sufrir reciclación vía glucoronidación y re-entrada celular. El proceso de metilación también está presente en la mucosa oral (Mallery *et al.*, 2011). A pesar de la degradación de las antocianinas por la digestión oral reportada en dichos estudios, las antocianinas pasan rápidamente por esta cavidad por lo que su degradación real correspondería al <5% en esta etapa de la digestión permitiendo a las antocianinas viajar hacia el estómago (Kamonpatana *et al.*, 2012).

2.4.1.2 Estómago

La fase gástrica es el siguiente paso de la digestión, donde pasará el alimento por el estómago para ser descompuesto en partículas más pequeñas para que los nutrientes sean absorbidos y metabolizados. Por lo tanto, se ha sugerido que las antocianinas tienen una rápida absorción en estómago (y también en intestino) por alcanzar a la una y media horas después de su ingesta su mayor concentración en sangre, su mayor absorción en el estómago se ha explicado debido a la estabilidad que adquieren en el medio ácido (pH 2) (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2012; Manach *et al.*, 2005; McDougall *et al.*, 2005; McGhie *et al.*, 2007; Talavéra *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2011). También se ha encontrado a los 15 minutos una concentración máxima en sangre de cianidina-3-glucósido. Por lo cual se ha propuesto al estómago como una área absorbente

de antocianinas (>20%) (Felgines *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2013; Kay *et al.*, 2006; McGhie *et al.*, 2007; Talavéra *et al.*, 2004).

Se ha indicado que en las células epiteliales de la mucosa gástrica las antocianinas se unen a la bilitranslocasa (transportador anión orgánico). Esta proteína podría favorecer su difusión y absorción en el sistema circulatorio después de haber pasado por el hígado (Faria *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2013; McGhie *et al.*, 2007; Passamonti *et al.*, 2003). En el hígado una parte de ellas son metabolizadas por reacciones de metilación, suforonidación y glucoronidación. Los metabolitos aquí generados se dirigen al intestino junto con la bilis (Fernandes *et al.*, 2013; McGhie *et al.*, 2007). Y las antocianinas glucosiladas que no son absorbidas continúan al intestino delgado (Fernandes *et al.*, 2013; McGhie *et al.*, 2007). Sin embargo, otros autores señalan que el estómago no tiene la capacidad de metabolizar antocianinas. Aunque han visto que posee enzimas conjugadoras tales como UDP-glucuronosil transferasa, sulfotransferasa y catecol-O-metil-transferasa (Fernandes *et al.*, 2013). Con la información que presentan estos estudios podríamos decir que el estómago es un área absorbiva para alguna cantidad de antocianinas ya que se mantienen estables por el medio ácido, y las que no son absorbidas pasan al siguiente órgano involucrado en la digestión.

2.4.1.3 Intestino delgado

El intestino delgado es considerado el órgano con mayor absorción de nutrientes durante el proceso digestivo y se divide en tres secciones: duodeno, yeyuno e íleon. En el duodeno las sales biliares y la pancreatina actúan sobre las antocianinas que permanecen en el lumen intestinal. Debido a su inestabilidad por el pH alcalino – neutro (pH 7.5 a 8) son transformadas a chalconas, pseudobases carbinol y bases quinoidales (Bermudez *et al.*, 2007; McDougall *et*

al., 2005). Pero también se ha descrito que esta inestabilidad se debe a su forma no acilada. Por lo cual su estabilidad mejora cuando aumenta la metoxilación de su aglicona hidrolizada (Ávila *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2013; McDougall *et al.*, 2005; Talavera *et al.*, 2004; Tavares *et al.*, 2012). La capacidad de absorción varía del 10.7% (malvidina-3-glucósido) al 22.4% (cianidina-3-glucósido) (Talavera *et al.*, 2004). Por lo tanto el intestino es considerado como un sitio de absorción rápido y eficaz (Fernandes *et al.*, 2013; Kay *et al.*, 2006). Aunque se ha visto que las antocianinas en este sitio reducen un 75% su bioaccesibilidad (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2012; McDougall *et al.*, 2005; McDougall *et al.*, 2007; Stalmach *et al.*, 2012; Wiese *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011).

Se han planteado dos mecanismos para la absorción de antocianinas en el intestino. Uno de ellos es la difusión pasiva a través de las membranas de las células epiteliales, ya que las agliconas de las antocianinas tienen gran hidrofobicidad. También se ha sugerido que, pueden filtrarse al torrente sanguíneo como productos de antocianina biodisponibles como ácidos hidroxibenzoico derivado del anillo B y el protocatecuico derivados de cianidina-3-O-glucósido (Ávila *et al.*, 2009; Kay, 2006; Liang *et al.*, 2012; McDougall *et al.*, 2005; McDougall *et al.*, 2007; Talavéra *et al.*, 2012; Tavares *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2011). Otro proceso es a partir del co-transporte sodio-glucosa o hidrólisis extracelular del glicósido vía Lactato Florizin Hidrolasa (LPH) en el borde de cepillo de los enterocitos (Kay *et al.*, 2006). El enterocito pretratado con antocianinas (200 µg/mL) absorbe en un 50% las antocianinas en función del tiempo. A pesar de estas propuestas sobre sus mecanismos de absorción se estima que sólo el 1% de las antocianinas alcanzarán a llegar a la circulación sanguínea (Ávila *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2009).

La detección de metabolitos de antocianinas puede deberse a diferentes reacciones conjugadoras de flavonoides en el intestino e hígado. La metilación es una reacción dirigida por las enzimas metiltransferasas. Estas enzimas

también son encontradas en hígado. La reacción más común es O-metilación catalizada por la catecol-O-metiltransferasa. Utilizando S-adenosilmetionina como cofactor. La glucoronidación es catalizada por la enzima UDP-glucoroniltransferasa. Esta también se encuentra en el hígado y los riñones (Kay *et al.*, 2006). Así esta enzima al actuar sobre las antocianinas forma glucorónidos (Felgines *et al.*, 2003). Los metabolitos presentes en plasma también pueden ser debido al ciclo enterohepático. Donde son absorbidos y transportados por los hepatocitos y subsecuentemente excretados con la bilis. En el cual el yeyuno puede hacer una segunda absorción de estos compuestos (Walton *et al.*, 2008). La circulación enterohepática también puede promover sulfación en el intestino y en el hepatocito. Desviando los metabolitos para reabsorberse después de la excreción biliar hasta la eliminación de la orina (Kay *et al.*, 2006). Así que en el intestino delgado a pesar de que las antocianinas pierden estabilidad por el pH alcalino – neutro una fracción de ellas son absorbidas y por medio de diferentes procesos metabólicos llegan al torrente sanguíneo para viajar a algún órgano y tener un efecto en la salud.

2.4.1.4 Intestino grueso

El intestino grueso es la última etapa del proceso digestivo, donde los compuestos que no fueron absorbidos y metabolizados en los órganos anteriores son preparados para ser desechados. Se ha sugerido que la mayor cantidad de antocianinas pasan intactas hasta una porción del colon y pueden ser metabolizadas por las bacterias colónicas como compuestos fenólicos (ácido protocatecuico). Aumentando su bioaccesibilidad y contribución a su actividad antioxidante (Ávila *et al.*, 2009; Hollands *et al.*, 2008; Kay *et al.*, 2006; McDougall *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2012; Stalmach *et al.*, 2012). A este sitio también llegan metabolitos fenólicos hepáticos por medio de la bilis donde pueden adherirse a

la matriz alimentaria por su estructura y mitad de azúcar aherida o pueden no ser absorbidos (Ávila *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2013). Por lo que pueden tardar de 20 minutos a dos horas en el proceso de deglicosilación (Ávila *et al.*, 2009). Y 48 horas para ser degradadas eficientemente (Hollands *et al.*, 2008). Las bacterias que estan presentes tiene una gran variedad de enzimas que hidrolizan esos compuestos fenólicos por medio de un potente sistema enzimático transformándolos en metabolios bacterianos (Ávila *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2013; Yang *et al.* 2011). De esta manera va en aumento la observación de los productos biodisponibles de antocianinas derivados del metabolismo colónico (Liang *et al.*, 2012; Stalmach *et al.*, 2012; Walton *et al.*, 2008).

2.4.1.5 Influencia de otros componentes alimentarios

Se ha observado que la biodisponibilidad de las antocianinas varía dependiendo de la co-ingestión de otros componentes alimentarios. Los alimentos están compuestos por diferentes nutrientes tales como hidratos de carbono, lípidos, proteínas, vitaminas y minerales. Afectando la absorción, excreción y bioactividad pero no en su metabolismo (Sengul *et al.*, 2014; Walton *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011).

2.4.1.5.1 Hidratos de carbono

Diversos estudios han evaluado el efecto de diferentes fuentes y tipos de hidratos de carbono. En un estudio *in vivo* la glucosa no influenciaba la absorción de la antocianina cianidina-3-glucósido (Felgines *et al.*, 2008). En otro estudio se observó que el cereal de trigo (Shredded Wheat, Nestlé, UK Ltd.) no influye sobre la absorción, metabolismo y biodisponibilidad de un extracto de antocianinas de

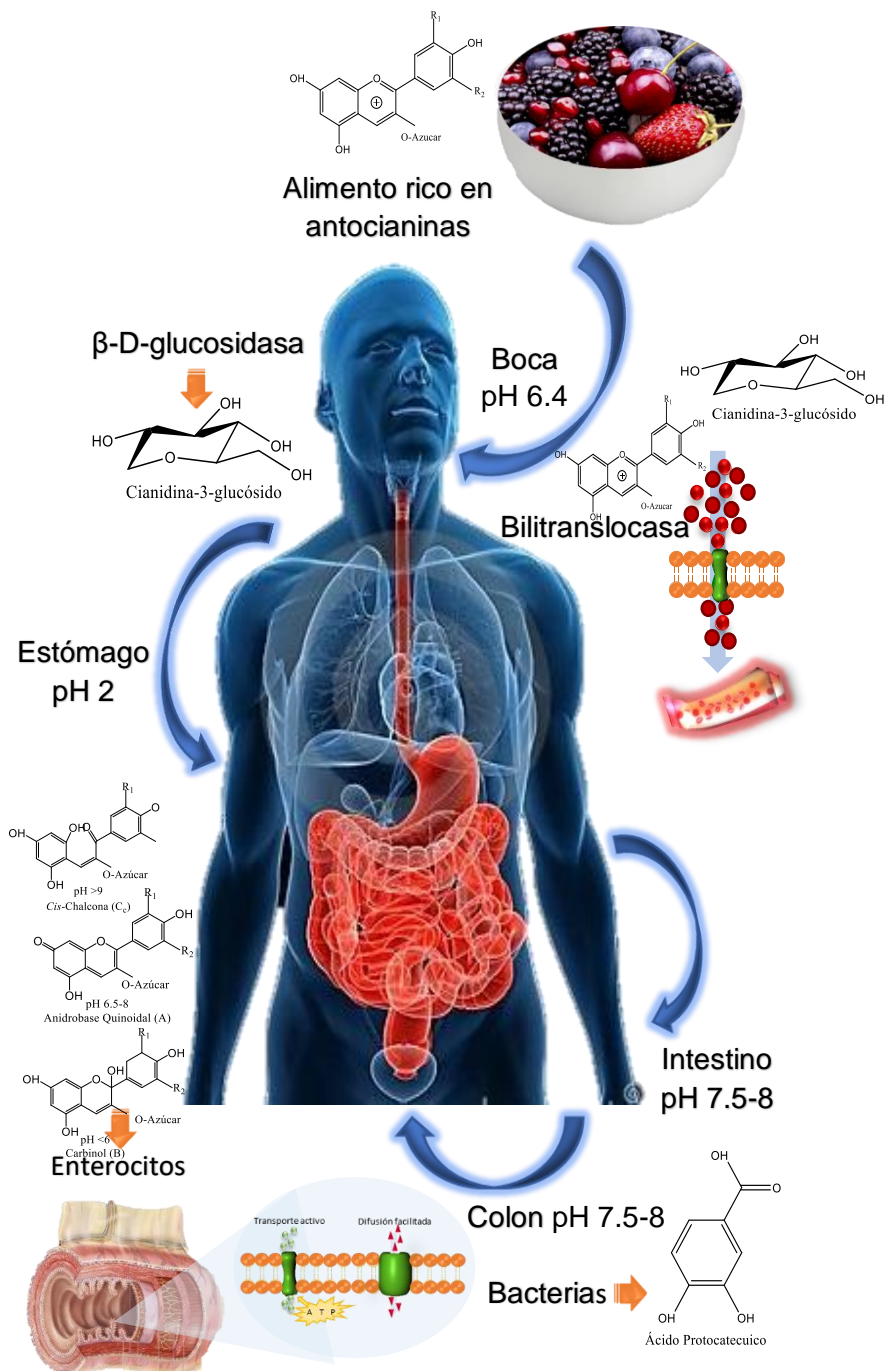


Figura 5. Proceso de digestión, metabolismo y absorción de las antocianinas. (Elaborada a partir de Ávila *et al.*, 2009; Bermúdez-Soto *et al.*, 2007; Felgines *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2013; Hollands *et al.*, 2008; Kay *et al.*, 2006; Kamonpatana *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2012; Mallery *et al.*, 2011; Manach *et al.*, 2005; McDougall *et al.*, 2005; McGhie *et al.*, 2007; Stelmach *et al.*, 2012; Talavéra *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2011)

frambuesa al someterse a una codigestión *in vitro* (McDougall *et al.*, 2005; Walton *et al.*, 2008). Otros cereales como el pan blanco no han afectado el contenido de compuestos fenólicos disponibles en plasma. Lo cual puede explicarse por que antocianinas de extracto de frambuesa fueron protegidas por este alimento en el tracto gastrointestinal. (McDougall *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2011). La harina de avena consumida junto a una mezcla de agua con ácido cítrico retrasó la absorción de antocianinas de grosella negra. Quizás por la reducción del total de antocianinas absorbidas en el intestino. Pero no mostró ninguna alteración en el metabolismo de antocianinas (Walton *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011). La tarta de arroz (con 79% contenido de hidratos de carbono) no influenció la biodisponibilidad de las antocianinas en un estudio *in vivo*. Tan sólo se observó un retraso en la aparición del pico de concentración máxima en plasma al ser administrado junto a jugo de grosella negra (Walton *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011). El alcohol no presenta algún efecto en la biodisponibilidad de las antocianinas. Pero causa que su flujo de absorción sea lento mejorando el transporte de antocianinas a través del transportador dos de gluosa (GLUT2) en las células epiteliales del intestino (Yang *et al.*, 2011). Otros compuestos como lactosa, pectina, celulosa, almidón no tuvieron efectos significantes sobre el contenido total de antocianinas de granada (Sengul *et al.*, 2014). De esta manera los hidratos de carbono no afectan el metabolismo y biodisponibilidad de las antocianinas, sin embargo algunos de estos alimentos beneficiaron su absorción al retrasar su estancia durante el proceso digestivo.

2.4.1.5.2 Proteínas

Algunos estudios han valorado el efecto de diferentes alimentos ricos en proteínas. Se ha visto que la absorción de antocianinas mostró tener poco incremento al combinarse con carne picada cocida. Posiblemente por la

protección que le pudiera dar este alimento a las antocianinas (McDougall *et al.*, 2005; Sengul *et al.*, 2014; Walton *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011). También se ha observado que el consumo de moras azules con leche de vaca no ha afectado en el nivel de eliminación de radicales libres por su capacidad antioxidante (Serafini *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando se combinó leche de vaca con chocolate negro durante la ingesta o en el proceso de manufactura disminuyó su capacidad antioxidante y la absorción plasmática de polifenoles (Wiese *et al.*, 2008). Se ha sugerido que la proteína de leche quela los polifenoles previniendo su absorción a través de las células del intestino (Sengul *et al.*, 2014; Serafini *et al.*, 2009; Wiese *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2011). Además se ha observado que la disminución de la actividad antioxidante puede asociarse con la cantidad de grasa que contenga la leche. Por lo que la leche entera podría disminuir en un 35% su potencial antioxidante en comparación con la semidescremada y la descremada en <30% y <25%, respectivamente (Serafine *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011). Otro estudio sugiere que el contenido total de antocianinas se puede ver afectado cuando se asocia con la proteína de soya (Sengul *et al.*, 2014). Los alimentos que fueron evaluados en los estudios mencionados no mostraron efectos que potencialicen la absorción, metabolismo y bioaccesibilidad de las antocianinas.

2.4.1.5.3 Lípidos

Pocos estudios han estimado el efecto de los diferentes tipos de grasas contenidos en los alimentos sobre las antocianinas. Al ingerir antocianinas con alimentos altos en grasa se representó un aumento en el nivel sérico de antocianinas. Lo cual pudo originarse por la prolongación del vaciamiento gástrico y la posterior disminución de su tránsito por el duodeno e íleon (Sengul *et al.*, 2014). Sin embargo, en otro estudio no se encontraron diferencias

significativas en la absorción y excreción urinaria al comer fresas con crema (Yang *et al.*, 2011). Tampoco se vio afectado el contenido total de antocianinas de granada durante la digestión gástrica cuando se mezclaron con ácidos grasos (ácido estérico y ácido linoleico) (Sengul *et al.*, 2014). Falta más evidencia científica para evaluar el efecto de las grasas sobre las antocianinas, ya que con los artículos que se mencionaron los alimentos ricos en grasas benefician la absorción de las antocianinas pero no ejercen algún efecto sobre su metabolismo y biodisponibilidad.

2.4.1.5.4 Micronutrientes y Compuestos Bioactivos

Varios estudios han valorado el efecto que tienen algunos micronutrientes con las antocianinas durante el proceso de digestión *in vitro*. Los flavonoles pueden proteger a las antocianinas y al ácido ascórbico de la oxidación. Pero cuando hay altas concentraciones de ácido ascórbico (80 mg/L) se acelera la degradación de antocianinas de jugo de cereza y naranja roja. Debido a la acumulación de productos degradados de ácido ascórbico y la consiguiente degradación de flavonoles. Aunque el ácido ascórbico se le confirió la función protectora de antocianinas de bayas de saúco y jugo de granada. Este último tras el tratamiento con peróxido de hidrógeno (Sengul *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2011). Se ha observado que algunos flavonoides del jugo de naranja roja pueden disminuir la degradación térmica de antocianinas (Yang *et al.*, 2011). Por otro lado, la quercetina-3-O-glucósido inhibe la absorción de cianidina-3-O-glucósido en el intestino de ratones (McGhie *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2011). Mientras que la catequina puede regenerar malvidina-3-O-glucósido y peonidina-3-O-glucósido al cambiar de posición sus átomos de oxígeno incrementando sus densidades y destruyendo su anillo aromático (Yang *et al.*, 2011). Además se ha observado

que las antocianinas al mezclarse con la proteína de leche (albúmina y β -caseína) aumentan la capacidad antioxidante (Arts *et al.*, 2002).

Otros componentes que también influyen en la disponibilidad de las antocianinas son los iones. Los metales que se han estudiado junto a las antocianinas son el cobre, cobalto, hierro, aluminio, magnesio y cadmio. Los investigadores tienen la hipótesis de que estas partículas les conferiran estabilidad a las antocianinas cuando se unan a su estructura química debido a la modificación que se genera en el enlace *o*-dihidroxi del anillo B presente en cianidina, petunidina y delphinidina (Boulton, 2001; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Por ejemplo, en otros estudios donde se han realizado digestiones *in vitro* con carotenoides extraídos de espinaca, jugos de tomate y zanahoria, néctar de albaricoque y ensalada se observó que el calcio, magnesio, zinc y hierro inhiben significativamente la micelarización y absorción en los enterocitos ocasionando que no se cumpla con su efecto antioxidante (Biehler *et al.*, 2011; Corte-Real *et al.*, 2017).

De esta manera las investigaciones sobre la interacción de los diferentes micronutrientes con las antocianinas nos sugieren que podrían conferirle protección durante el proceso digestivo y potencializar su actividad antioxidante. Por lo que también esperaríamos de los iones beneficiaran la absorción, metabolismo y biodisponibilidad de las antocianinas.

2.5 Efectos en la Salud de las Antocianinas

La inclusión de verduras y frutas en la dieta favorece el consumo de polifenoles que benefician el estado de salud de las personas (Basu *et al.*, 2010; Duthie, 2007; Guo y Ling, 2015; Stoner *et al.*, 2010; Zafra-Stone *et al.*, 2007). De los cuales, las antocianinas han tomado gran importancia debido a sus mecanismos de acción (Stoner *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2011; Zafra-Stone *et al.*, 2007). Se han observado actividades antioxidantes y antiinflamatorias que previenen el

retraso o inicio de enfermedades crónicas degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad, enfermedades pulmonares y neuronales (Basu *et al.*, 2010; Cassidy *et al.*, 2015; Guo y Ling, 2015; Liobikas *et al.*, 2016; Metha *et al.*, 2016; Mink *et al.*, 2007; Prior y Wu, 2006; Wallace *et al.*, 2011; Zafra-Stone *et al.*, 2007). Aunque se ha visto que el estudiar el alimento completo dificulta afirmar que estos componentes dietéticos son estables para ejercer un efecto protector (Duthie, 2007).

2.5.1 Cáncer

Se ha investigado muy poco sobre el consumo de bayas para la prevención del cáncer. Y de ellos, se ha dicho que disminuyen el riesgo de desarrollar la enfermedad debido al consumo de alimentos ricos en compuesto bioactivos (polifenoles, flavonoides y antocianinas) ya que disminuyen las mutaciones de las células. Y se ha sugerido que estos compuestos vegetales modifican la señalización celular que altera el material genético y su transformación maligna (Duthie, 2007; Stoner *et al.*, 2010; Wang y Stoner, 2008; Zafra-Stone *et al.*, 2007).

Estudios previos han utilizado jugos y preparados homogéneos de moras, fresas y frambuesas para evaluar el efecto de las antocianinas sobre las células cancerígenas. Y se ha visto que las moras han suprimido el 2-amino antraceno (2-AA) inducido por mutagenesis en bacterias. Y han protegido a las células endoteliales vasculares humanas contra el peroxinitrito oxidativo inducido por ruptura de la hebra de ADN (Duthie, 2007; Zafra-Stone *et al.*, 2007). Lala *et al.*, encontró que la administración de dietas ricas en antocianinas de grosella negra, uva de vino y arándano en ratas reducen significativamente la reproducción de células cancerígenas en colon en 26% - 29%. Estos resultados pueden sugerir que la proliferación celular puede verse influida por la estructura química individual de cada antocianina (Duthie, 2007; He y Giusti, 2010; Stoner *et al.*,

2010; Wang y Stoner, 2008). El extracto de arándano y torta de arándano ha reportado ser inhibidor de la fase de proliferación celular G1 e inicio de la apoptosis en células de cáncer de seno, próstata, piel, cerebro e hígado (Duthie, 2007; Wang y Stoner, 2008). La inhibición de la proliferación de células MCF7 (cáncer de seno) y HT29 (cáncer de colon) puede disminuir hasta un 74% siguiendo una exposición continua a varios extractos de frutas y bayas (mora azul, grosella negra y frambuesa) a concentraciones entre 0.025% y 0.5% (Stoner *et al.*, 2010). Ratones alimentados con "Mitroselect" (antocianinas comerciales de arándano) redujo la formación de adenomas en ratones alimentados por 12 semanas con una mezcla de antocianinas a concentraciones de 0.03%, 0.1% ó 0.3% ya que fueron encontradas en la mucosa intestinal. Se ha visto que la cianidina y otros glicósidos han tenido un efecto antimutagénico observando una inhibición del daño oxidativo del ADN. La quercetina y cianidina-3-glucósido previenen el daño oxidativo del ADN en células colónicas normales humanas "in vitro". Cooke *et al.*, también observó que el número de adenomas en la mucosa intestinal de ratones APC alimentados con una mezcla de antocianinas de arándano o cianidina-3-glucósido pura disminuyeron un 45% y 30%, respectivamente (Duthie, 2007; Stoner *et al.*, 2010; Wang y Stoner, 2008). También se ha visto que las antocianinas de frambuesa negra tuvieron una actividad quimiopreventiva eficaz al reducir del 42% al 47% la cantidad de tumores en ratas con cáncer de esófago (Stoner *et al.*, 2010; Wang y Stoner, 2008; Zafra-Stone *et al.*, 2007). Además, se han realizado estudios con células cancerígenas de hígado y antocianinas, donde Shih *et al.*, observó la mejora de la actividad antioxidante tras ser activada la enzima glutatión reductasa en dicho tejido (Wang y Stoner, 2008; Zafra-Stone *et al.*, 2007). Aunque también se ha sugerido que la cianidina de frambuesa negra como el mayor componente para regular la expresión del ADN *in vitro* e *in vivo* (Stoner *et al.*, 2010; Wang y Stoner, 2008).

Aunque se ha observado en otros estudios *in vivo* que personas sanas que toman jugo de grosella negra (aportaba 600mg/L de antocianinas y 210mg/L de vitamina C) por 3 semanas provocó un pequeño cambio pero significativo en el daño oxidativo del ADN. Aunque después se observó que el efecto había sido ocasionado por consecuencia del pre-oxidante vitamina C ya que en el grupo control las antocianinas no tuvieron ningún efecto. También se investigó si habría alguna influencia de las antocianinas en los pacientes con cáncer bajo tratamiento de quimioterapia y se observó que las antocianinas no tienen efecto (Wang y Stoner, 2008). Otros estudios llegan a la conclusión de que la acción de las antocianinas en roedores no son efectivos ya que no son cuantificables en sangre a pesar de ser absorbidas (Stoner *et al.*, 2010).

El rol de las antocianinas de diferentes fuentes alimentarias en el cáncer podrían ser benéfico, ya que la mayoría de los estudios proponen a las antocianinas como componentes reguladores de la proliferación celular y preventivos del daño oxidativo al ADN.

2.5.2 Obesidad

La obesidad es una patología que se caracteriza por el exceso de peso y se considera un factor para desencadenar otras enfermedades. Y se ha observado en diferentes estudios el efecto que tienen las antocianinas sobre la obesidad. En un estudio *in vivo* con hamsters con hipercolesterolemia el suplemento OptyBerry causó una disminución de peso (aproximadamente del 8% de su peso inicial), no teniendo claro si este efecto resultó de la disminución del apetito o por el aumento del metabolismo (Zafra-Stone *et al.*, 2007). En un estudio donde se suministró agua con antocianinas purificadas de mora azul a ratones por 90 días se vió que retrasan el desarrollo de la obesidad y las dislipidemias (Basu *et al.*, 2010). Mientras que en estudios *in vivo* utilizando antocianinas de soya negra

junto a una dieta alta en grasa se vió que hay una disminución de peso y un aumento en la concentración de colesterol. Sin embargo bajo el mismo régimen alimentario pero con antocianinas de mora azul se vió muy poca diferencia en el peso y grasa corporal en ratas obesas (He y Giusti, 2010). Tsuda *et al.*, en su estudio observó que las antocianinas podrían regular la expresión de los adipocitos y mejorar su función en la obesidad y la diabetes (Basu *et al.*, 2010; He y Giusti, 2010; Zafra-Stone *et al.*, 2007). A pesar de que los resultados de los estudios son contradictorios, la investigación sobre el efecto de las antocianinas en el peso corporal va en aumento.

2.5.3 Enfermedades Neuronales

Algunos estudios han evaluado el efecto de las antocianinas sobre las enfermedades del sistema nervioso. En una investigación se inyectó antocianinas de arándanos en cerebros de ratas (200 mg/kg/d) por 5 días y se observó que hubo mediación de la hormona tiroidea T3 mejorando la actividad cognitiva, visual y sensorial (Zafra-Stone *et al.*, 2007). La poca evidencia científica sobre la influencia de las antocianinas en los trastornos del sistema nervioso nos impide tener una idea clara de los efectos que tengan en la salud.

2.5.4 Diabetes

Numerosos estudios sugieren que el aumento del consumo de alimentos ricos en antociannas podrían disminuir la incidencia de diabetes (Guo y Ling, 2015). Matsui *et al.*, encontró que las antocianinas pueden tener una capacidad antihiper glucémica (He y Giusti, 2010; Zafra-Stone *et al.*, 2007). Las antocianinas de bayas podrían mejorar la retinopatía diabética debido a que estos compuestos mejoran la pigmentación ocular y la circulación de los capilares oculares (He y

Giusti, 2010; Zafra-Stone *et al.*, 2007). Aunque en otros estudios no comparten este efecto positivo debido a que observan variaciones en la metodología, fuentes de antocianinas y el tipo de personas evaluadas (He y Giusti, 2010). Se ha observado que las mezclas o extractos de antocianinas de grosella negra, arándano, mora azul, uva de vino y fresas en la diabetes avanzada pueden mediar positivamente el proceso de glicosilación ocasionando que la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) ya no se dé aceleradamente (Basu *et al.*, 2010; He y Giusti, 2010). En un estudio *in vivo* donde se dieron aproximadamente 500 g de fresa liofilizada durante 6 semanas se observó que disminuyó la cantidad de la proteína C reactiva (CRP). Es decir, que los pacientes diabéticos podrían reducir el riesgo de tener complicaciones cardiovasculares. Sin embargo, en otros estudios donde se utilizó una bebida de fresa que contenía de 78 a 155 mg/d de antocianinas no se observó alguna influencia sobre los valores de la proteína C reactiva. Aunque si se vieron efectos positivos en el colesterol y concentración de LDL (Cassidy *et al.*, 2015). Sin embargo, aunque existe controversia en los efectos de las antocianinas en la diabetes, las investigaciones sobre el tema van en aumento.

2.5.5 Enfermedades Cardiovasculares

El consumo de compuestos dietéticos que se encuentran dentro de las verduras y frutas se han relacionado con el bajo riesgo de padecer alguna enfermedad cardiovascular (Basu, *et al.*, 2010; Cassidy *et al.*, 2015). Datos del Estudio Factor de Riesgo de Cardiopatía Isquémica Kuopio (por sus siglas en inglés KIHFD) mostraron que los hombres con una ingesta diaria de más de 408 g de bayas tuvieron un menor riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular, a comparación con hombres que consumieron menos de 133 g al día de bayas ambos en un período de 12.8 años. En contraste con mujeres postmenopáusicas donde se observó que también había una disminución del

riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular al comer 0.2 mg diarios de antocianinas contenidas en fresas y moras azules en un período de 16 años (Basu *et al.*, 2010). Pergola *et al.*, vió que las antocianinas de grosella negra regulan la hipertensión al disminuir el daño oxidativo por óxido nítrico y aumentar la respuesta proinflamatoria. Xu *et al.*, y Lazze *et al.*, han observado este mismo efecto en vacas al suministrar cianidina-3-glucósido (Basu *et al.*, 2010; He y Giusti, 2010). También se ha visto que las antocianinas de bayas pueden interrumpir el avance de la arterioesclerosis debido a la disminución de los radicales libres y el efecto antiinflamatorio (Basu *et al.*, 2010). Estos estudios sugieren que las antocianinas si tienen un efecto sobre algunas enfermedades cardiovasculares debido a que aumentan su actividad como reguladoras del proceso de inflamación y disminuyen el daño oxidativo a las células.

2.5.6 Enfermedades Pulmonares

Se ha estudiado muy poco sobre la acción que pueden tener las antocianinas en la fisiología pulmonar (Mehta *et al.*, 2016). Pero en un estudio *in vivo* se administró cianidina-3-glucósido de grosella negra a ratas con inflamación en los pulmones y se vió que los parámetros de inflamación disminuyeron, este efecto se asoció a la dosis (He y Giusti, 2010). Y en otro estudio, se observó que el consumo de diferentes subclases de flavonoides (antocianinas, flavononas, flavonas-3-ols, flavonoles y polímeros) evaluadas mediante un cuestionario de frecuencia a 839 sujetos durante 16 años mejoró la disminución de la función pulmonar relacionada con la edad (Mehta *et al.*, 2016). La realización de más investigación sobre la influencia de las antocianinas sobre las enfermedades pulmonares nos podrían dar un panorama más amplio sobre si su efecto si es benéfico para la mejora del estado de salud como propusieron los estudios de He y Giusti (2010) y Mehta *et al.* (2016).

3. JUSTIFICACIÓN

Las antocianinas son compuestos solubles en agua que se encuentran en los cloroplastos de la cáscara, hojas y pulpa de algunas hortalizas y frutas. Estos compuestos son los responsables de dar color azul, púrpura y rojo a los alimentos y sus concentraciones varían según las condiciones en las que se desarrollen los fruta. Las antocianinas más abundantes en la naturaleza son la cianidina, delfinidina, petunidina, malvidina, peonidina y pelargonidina.

La inclusión de hortalizas y frutas en la dieta proporciona el consumo de compuestos bioactivos que benefician el estado de salud de las personas. De los cuales, las antocianinas han tomado gran importancia debido a sus actividades antioxidantes y antiinflamatorias que favorecen la prevención de algunas enfermedades crónicas degenerativas. Sin embargo, dichos efectos se ven limitados por la baja estabilidad digestiva y biodisponibilidad de estos compuestos tras su consumo.

La realización de la simulación del proceso gastrointestinal *in vitro* nos permite observar cómo las antocianinas viajan a través de los diferentes órganos de interés, y así evaluar su digestión, absorción y metabolismo. Se ha visto que el intestino delgado es el órgano con mayor absorción y metabolismo de las antocianinas. Y en algunos estudios se han realizado co-digestiones para observar influencia de macro- y micro- nutrientes sobre la biodisponibilidad de las antocianinas. Los hidratos de carbono y lípidos se han considerado como convenientes para mejorar la estabilidad y absorción de las antocianinas. También se ha sugerido que los iones actúan como protectores de las antocianinas durante el proceso digestivo, incrementando su actividad antioxidante. El cobre, cobalto, hierro, aluminio, magnesio y cadmio son algunos de los metales que se han utilizado en diferentes estudios para evaluar su efecto en la estabilidad de las antocianinas. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han realizado con extractos frutales ricos en antocianinas pero que a su vez

también contienen otros componentes propios de las diferentes matrices alimentarias. Por lo tanto, el efecto de otros nutrientes en la estabilidad digestiva, biodisponibilidad y bioactividad de las antocianinas podrían estar enmascarando la función de los componentes del fruto que se hayan estudiado.

Por lo tanto, en este estudio se aislaron las antocianinas de los diferentes extractos de frutas a través de la técnica de separación en fase sólida por medio de las resinas sintéticas Amberlite XAD-7 y Sephadex LH-20. Ya que estas se han considerado como las mejores resinas para aislar antocianinas debido a sus propiedades fisicoquímicas y su relativo bajo costo. Esto es para dar un resultado más claro sobre su biodisponibilidad en el organismo a través de la simulación del proceso digestivo *in vitro*, ya que se ha observado que las antocianinas se absorben muy poco poniendo en duda los beneficios a la salud que se les atribuye. Además de investigar si la co-digestión con iones divalentes de hierro, zinc, magnesio y calcio pudiera brindar un efecto protector a las antocianinas durante la digestión gastrointestinal.

4. HIPÓTESIS

1. La estabilidad gastrointestinal y actividad antioxidante *in vitro* de las antocianinas aisladas de las frutas de zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino aumentará por la co-digestión con iones divalentes (hierro, zinc, magnesio y calcio) y variará en función del tipo de antocianinas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar la estabilidad gastrointestinal y bioactividad *in vitro* de antocianinas con diferente estructura química en función de la presencia de iones divalentes (hierro, zinc, magnesio y calcio).

5.2 Objetivos Específicos

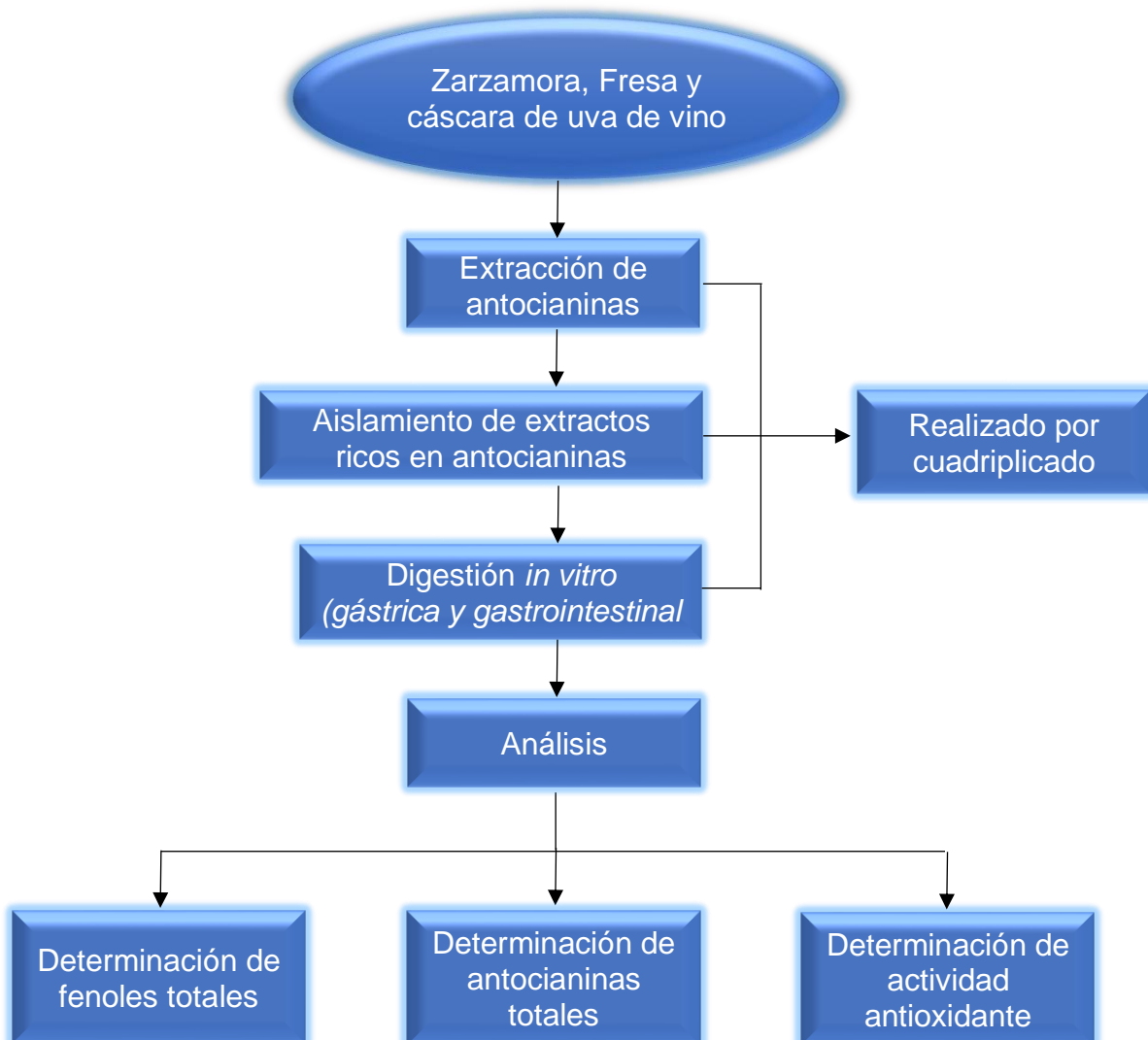
1. Evaluar el efecto de la estructura química de las antocianinas aisladas de las frutas de zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino en su estabilidad durante un proceso de digestión *in vitro*.
2. Valorar el efecto de los iones divalentes de hierro, zinc, magnesio y calcio sobre la estabilidad gastrointestinal *in vitro* de las antociaininas aisladas de las frutas de zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino.
3. Examinar la capacidad antioxidante de las antocianinas aisladas de las frutas de zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino tras un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* en presencia de iones divalentes (hierro, zinc, magnesio y calcio).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Tipo de Estudio

Experimental

6.2 Diseño del Estudio



6.3 Reactivos y Materia Vegetal

Los reactivos a utilizar fueron comprados en diferentes empresas. El 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-8-ácido fulfónico) sal de diamonio, 2,4,6 tris (2-pridil)-s-trinacina, acetato trihidrato de sodio, hexahidrato clorhidro metal III, persulfato de potasio y reactivo de Follin Ciocalteu 2N fueron de la marca Sigma-Adrich. La acetona, ácido clorhídrico 1M y etanol fueron de la marca Jalmek. Metanol HPLC fue de la marca Tedia. El cloruro de potasio e hidróxido de sodio fueron de la marca CTR y de Fermont se compró la fenolftaleína. Las resinas Sephadex LH-20 y Amberlite XAD-7 fueron de la marca GE Health-Care y Sigma-Aldrich, respectivamente. El material vegetal a utilizar fue fresa, zarzamora y cáscara de uva de vino. La fresa (*Fragaria*) se compró en presentación congelada en el supermercado HEB (La Glorieta Fruits Products S.A. de C.V., cultivadas en Michoacán, México). La cáscara de uva y zarzamora (*Rubus sp.*) fueron donados por productores locales de la Ciudad Cuauhtémoc, Chihuahua. Todas las muestras recolectadas fueron almacenadas hasta su uso a una temperatura de -20 °C.

6.4 Extracción de Antocianinas

La extracción de antocianinas de las diferentes matrices frutales se realizó en base a la metodología sugerida por Mertz *et al.* (2007) con algunas modificaciones (Figura 6). Se tomaron 15 g de cáscara de uva de vino, 50 g de zarzamora y 100 g de fresa previamente trituradas para posteriormente ser homogeneizadas (Ultra Turrax T18 digital, IKA, Alemania). La homogenización se llevo a cabo con 100 mL de solución de extracción que constó de acetona/agua/ácido trifluoroacético (ATF) a una concentración de 70:29.9:0.01 (v/v/v). Después la mezcla se sometió a un tratamiento de sonicación por cinco minutos (modelo 1510R-MT, Branson, México). Posteriormente la mezcla se

refrigeró a 4 °C durante una hora en oscuridad. Después el extracto fue filtrado al vacío y los residuos fueron nuevamente disueltos en 30 mL de la solución de extracción y la mezcla se sometió a tratamiento de sonicación por cinco minutos. El extracto nuevamente fue filtrado al vacío y los residuos recibieron el mismo tratamiento descrito anteriormente una vez más. Para obtener así en la tercera filtración residuos despigmentados. Posteriormente se realizó una separación líquido-líquido con 50 mL de acetato de etilo en un embudo de separación. Este proceso se repitió cuatro veces para asegurar la separación de compuestos no polares de los extractos acuosos ricos en antocianinas. La muestra obtenida se rotaevaporó al vacío utilizando un rotavapor (modelo R-124, BÜCHI®, Nueva York, EE.UU.) a 39 °C para eliminar el acetato de etilo. El extracto acuoso se almacenó a -20 °C en la oscuridad hasta su uso.

6.5 Aislamiento de extractos de Antocianinas

Para la siguiente etapa se contó con columnas cargadas con resinas de Amberlite XAD-7 y Sephadex LH-20 (que constaban de un diámetro de cinco centímetros y 35 cm de altura) así como se muestra en la Figura 6. Estas fueron acondicionadas con diferentes soluciones. Para acondicionar la columna de Amberlite XAD-7 se preparó agua acidificada a pH 2 con ácido trifluoroacético (ATF) (dos litros) (pH Stat 900 Touch Control, Metrohm, Suiza) recorriendo la columna a una velocidad e flujo de 1.5 mL/min. Y para Sephadex LH-20 se prepararon dos litros de etanol 10% acidificado a pH 2 con ATF (pH Stat 900 Touch Control, Metrohm, Suiza) a una concentración de etanol/agua, 10:90 (v/v) y se hizo pasar a una velocidad de flujo de 0.75 mL/min . Al haber acondicionado las columnas se prosiguió a cargar los extractos acuosos obtenidos de la etapa de extracción. La muestra se cargó primeramente en la columna Amberlite XAD-7 para separar compuestos polares indeseables como sales, hidratos de carbono, fibras solubles y proteínas. Una vez que se cargó la muestra a la columna se hizo pasar dos litros de agua

acidificada a pH 2 con ATF (pH Stat 900 Touch Control, Metrohm, Suiza). Al terminar se le pasaron 500 mL de etanol acidificado al 0.3% con ATF (pH Stat 900 Touch Control, Metrohm, Suiza), para hacer que eluyeran las antocianinas. La muestra se recolectó para posteriormente evaluar su absorbancia a través de un espectrofotómetro de rayos UV- Vis (modelo 8453, Aglient, China). Posteriormente la columna fue nuevamente acondicionada para cargar una nueva muestra. La muestra recolectada de Amberlite XAD-7 tras haber medido la absorbancia se rotaevaporó para eliminar el etanol y obtener aproximadamente cinco mililitros de extracto acuoso que posteriormente se cargaría a la columna con la resina Sephadex LH-20. Una vez que se cargó la muestra a la columna de Sephadex LH-20, se pasó un litro de etanol 10% acidificado a pH 2 con ATF (pH Stat 900 Touch Control, Metrohm, Suiza) y se empezó la recolección de la muestra. La recolección se obtuvo hasta que la resina dejara de tener color y para esto también hubo necesidad de pasar etanol 10%, 40% y 80%, todas a pH 2 con ATF (pH Stat 900 Touch Control, Metrohm, Suiza). Al haber terminado la elución de la fase móvil se descoloró la columna y se volvió a acondicionar para cargar la nueva muestra. Se midió la absorbancia de los tubos obtenidos para valorar las fracciones ricas en antocianinas. Finalmente, los eluidos fueron concentrados usando un rotavapor (modelo R-124, BÜCHI, Nueva York, EE.UU.) a 39 °C para evaporar el etanol. Habiendo seleccionado las franjas se rotaevaporaron y almacenaron en el congelador a -20 °C.

6.6 Digestion *in vitro*

Las digestiones *in vitro* simulan las condiciones gastrointestinales más aproximadas a las presentes en los seres humanos. Esto es para analizar la cantidad de antocianinas biodisponibles durante el proceso digestivo según la metodología propuesta por Bouayed *et al.*, 2011 con algunas modificaciones. La cantidad de iones se decidió en base a lo sugerido por Corte-Real *et al.* (2017) y

la recomendación para personas estadounidenses según el RDA (Recomendación Dietética Asignada), AI (Adecuada Ingesta) y UL (Nivel Máximo de Consumo Tolerable). Estos valores de micronutrientes se compararon con el IDR (Ingesta Diaria Recomendada) y el IDS (Ingesta Diaria Sugerida) que son las referencias de consumo para población mexicana y se observó que las recomendaciones para ambas poblaciones eran similares. La cantidad de micronutrientes utilizados fue de hierro 15 mg/L, zinc 12.5 mg/L, magnesio 300 mg/L y calcio 1000 mg/L considerando la ingesta diaria recomendada en un volumen gastrointestinal de dos litros. Adquiriendo en 12.5 mL de digestión una concentración de 0.015 mg/mL de hierro, 0.0125mg/mL de zinc, 0.3 mg/mL de magnesio y 1.0 mg/mL de calcio.

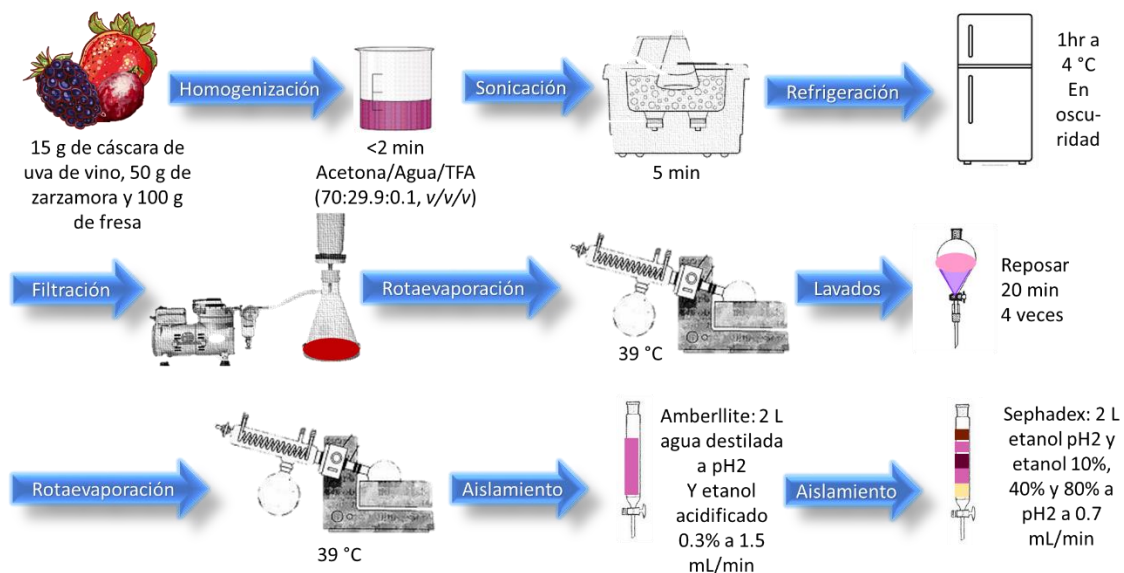


Figura 6. Procedimiento de extracción y aislamiento de antocianinas a partir de diferentes frutas

6.6.1 Fase Gástrica

Antes de iniciar el proceso, las diferentes muestras obtenidas anteriormente ya liofilizadas se mezclaron para disminuir la variabilidad entre las repeticiones de extracción. Además se obtuvo muy poco polvo muestra. Por lo que las franjas obtenidas de cada fruta se mezclaron para tener un único concentrado de antocianinas por fruta. Los concentrados de antocianinas aisladas de los diferentes frutos se trasladaron a dos microtubos de dos mililitros que posteriormente fueron almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Para las digestiones sin iones divalentes se agregó $50\text{ }\mu\text{L}$ de antocianinas aisladas con o sin iones divalentes ($500\text{ }\mu\text{L}$) y se ajustó el volumen a ocho mililitros con solución salina fisiológica. Después se ajustó el pH a 3.00 con HCl 1.00 N. Para a continuación agregar $500\text{ }\mu\text{L}$ de solución pepsina con una concentración de 40 mg/mL diluida en HCl 0.1 M. Posteriormente se ajustó el volumen a 10 mL para incubarlo por una hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 100 rpm en un baño de termoagitación (Precision SWB15, Thermo Scientific, Nuevo Hampshire, EE. UU.) para simular los movimientos peristálticos del estómago y la temperatura corporal. Al final del período se tomó una alícuota de un mililitro y se repuso el volumen extraído con solución salina fisiológica y se continuó con la fase intestinal.

6.6.2 Fase Intestinal

Una vez concluida la fase gástrica inmediatamente se colocaron los tubos en una hielera para detener el proceso de digestión. De forma consecutiva a la fase gástrica se agregaron $500\text{ }\mu\text{L}$ de cada sal biliar previamente preparada con NaHCO_3 0.075 M (taurocolato 0.75 mmol/L, taurodeoxicolato 0.45 mmol/L y

glicodeoxicolato 0.80 mmol/L) al tubo con la mezcla gástrica. Posteriormente se agregaron 500 μ L de solución pancreatina a una concentración 2 mg/mL diluida también en NaHCO_3 al 0.075M. Se ajustó el pH a 7.00 con NaOH 1.0 M. Y el volumen se ajustó a 12.5 mL. La mezcla se incubó por dos horas a 37 °C y 100 rpm en un baño de termoagitación (Precision SWB15, Thermo Scientific, Nuevo Hampshire, EE. UU.). Al final del proceso se tomaron alícuotas de un mililitro. Las alícuotas se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

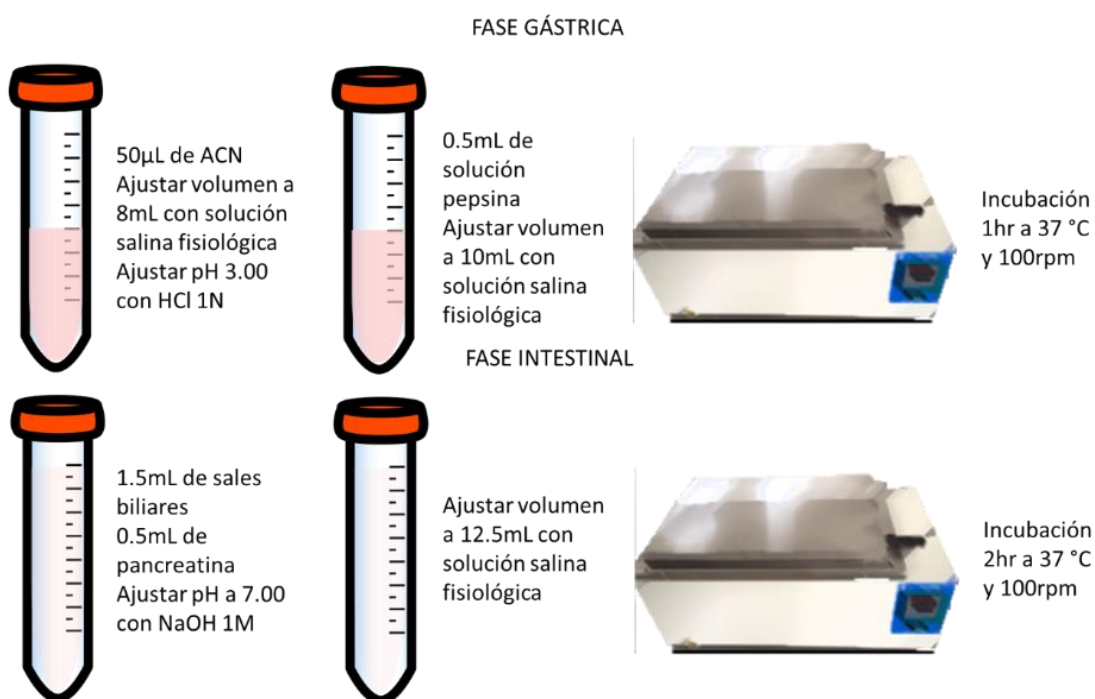


Figura 7. Proceso de digestión *in vitro* empleado en este estudio

6.7 Estabilidad Gastrointestinal de Compuestos Fenólicos Totales

El contenido total de fenoles se determinó según la metodología propuesta por Villareal-Lozoya *et al.* (2007). En un placa de pozos para elisa se agregaron 13 μ L de muestra, 208 μ L de agua nanopura y 13 μ L de reactivo Folin-Ciocalleu. Se

dejó reposar la mezcla por tres minutos. Después se añadieron 26 μL de Na_2CO_3 a una concentración de 1 N. Se selló la placa con doble capa de parafilm. Y se dejó reposar en oscuridad durante dos horas. Finalmente se leyeron las absorbancias a 750 nm usando un lector de microplacas MRX (Dynex Technology, Virginia, EE. UU.).

6.8 Estabilidad Gastrointestinal de Antocianinas Totales

La cuantificación de las antocianinas totales se realizó en base a la metodología propuesta por Wrolstad *et al.* (2005). En cubetas para espectrofotómetro se colocó el blanco de agua destilada para calibrar las absorbancias a 520 nm y 700 nm. Posteriormente 200 μL de muestra se mezclaron con 1.8 mL de cloruro de potasio 0.025 M a pH 1.00 o 1.8 mL de acetato de sodio 0.4 M a pH 4.5. Las mezclas se dejaron en reposo 15 minutos para que se equilibraran. Después, se midieron las absorbancias a 520 nm y 700 nm las digestiones gástricas y gastrointestinales. Posteriormente se calculó la absorbancia de las muestras mediante la siguiente fórmula:

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

Donde:

A = absorbancia

$A_{\lambda_{\text{vis-max}}}$ = Absorbancia de longitud de onda máxima (520 nm)

A_{700} = Absorbancia de longitud de onda a los 700 nm

En base a los resultados obtenidos del cálculo de las absorbancias enseguida se pudo calcular la concentración total de antocianinas con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (mcg/L)} = [(A * PM * 1000) / (\epsilon * 1)] * 1000$$

Donde:

A = absorbancia de la muestra

PM = peso molecular de la antocianina más abundante en la fruta (449.2 g/mol cianidina-3-glucósido, 433.2 g/mol pelargonidina-3-glucósido y 493.2 g/mol malvidina-3-glucósido)

ϵ = absortividad molar de la antocianina más abundante en la fruta (26900 cianidina-3-glucósido, 22390 pelargonidina-3-glucósido y 28000 malvidina-3-glucósido)

6.9 Estimación de la Actividad Antioxidante

6.9.1 Prueba FRAP

Para realizar la prueba FRAP se siguió la metodología propuesta por Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones. La solución FRAP se preparó mezclando 25 mL de buffer de acetato a una concentración de 300 mmol/L y ajustado a un pH de 3.6, 2.5 mL de solución de 2,4,6-tripiryridyl-s-triazine (TPTZ) diluido en ácido clorhídrico a una concentración de 40 mmol/L y 2.5 mL solución $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 20 mmol/L. Después se utilizaron 280 μL de solución FRAP para mezclarlos con 20 μL de cada muestra. Se incubaron por 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Al final se registraron las absorbancias de cada muestra a 593 nm.

6.9.2 Prueba DPPH

Para realizar la prueba DPPH se siguió la metodología sugerida por Brand-Williams *et al.* (1995) con algunas modificaciones. Se preparó el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) con metanol a una concentración de 25 mg/L. Después en la placa de pozos se agregaron 280 μ L de solución DPPH y 20 μ L de muestra. Para la muestra blanco se agregaron 280 μ L de solución DPPH y 20 μ L de agua acidificada al 0.1% con ácido trifluoroacético. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente por 30 minutos en oscuridad. Posteriormente se tomó lectura de las absorbancias a 515 nm.

6.10 Análisis Estadístico

Todos los procedimientos se realizaron por cuadruplicado. Los datos se expresaron como la media \pm error estándar. Para elaborar las comparaciones entre las antocianinas y la digestión gástrica y gastrointestinal con y sin iones se realizaron pruebas de ANOVA con una significancia $p < 0.05$. Se realizó la prueba post-hoc de Tukey-Kramer $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa SAS Inc. 9.0 (SAS Institute Inc., Carolina del Norte, Estados Unidos). La representación gráfica de los resultados se realizó en el programa Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc., California, Estados Unidos).

6.11 Variables

6.11.1 Variables Dependientes

Las variables dependientes de este estudio fueron la estabilidad de las antocianinas durante la digestión (tanto en la fase gástrica y gastrointestinal). La cantidad de fenoles y antocianinas totales que se encontraron después de las digestiones gástricas y gastrointestinales. Así como la capacidad antioxidante.

6.11.2 Variables independientes

Las variables independientes a considerar fueron la estructura química de las antocianinas y la presencia de los iones divalentes de hierro, zinc, magnesio y calcio.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Extracción de Antocianinas

El procedimiento de extracción y aislamiento de los extractos de fruta de zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino nos permitió obtener tres concentrado de antocianinas. El primer paso para la extracción se llevó acabo mediante 4 lavados de etil acetato (Figura 8). Estos lavados disminuyeron el contenido de otros compuestos no polares diferentes a las antocianinas presentes en la mezcla (compuestos fenólicos liposolubles, carotenoides y clorofilas) ya que la polaridad de las antocianinas las hacen solubles en agua (Wang *et al.*, 2014). En el primer lavado (línea color negra) podemos ver que hay una línea continua alrededor de los 400 nm hasta los 600 nm. Lo cual puede reflejar la prescencia de otros compuestos como carotenoides ($\lambda = 470$ nm) y clorofilas ($\lambda = 517$ nm) (Cervantes-Paz *et al.*, 2014; Wrolstad *et al.*, 2005). La reducción consecutiva de la absorbancia en este rango de longitudes de onda que se observa entre los lavados demuestra la eficiencia para separar las antocianinas de otros compuestos no polares. Tras el último lavado se obtuvo un espectro de absorción con dos picos máximos a los 280 nm y 520 nm. Siendo este espectro de absorción característico de las antocianinas. Estos resultados coinciden con los encontrados en el trabajo de Wang *et al.*, 2014 donde ellos observaron que su extracto crudo (primer lavado con etil acetato) se podía apreciar una gran cantidad de compuesto fenólicos no antocianinas y conforme aumentaron el número de lavados se percataron de que estos compuestos disminuyeron. Coincidiendo con la premisa de que el etilacetato es un solvente eficiente para obtener antocianinas con un alto grado de pureza a partir de extractos crudos de frutas.

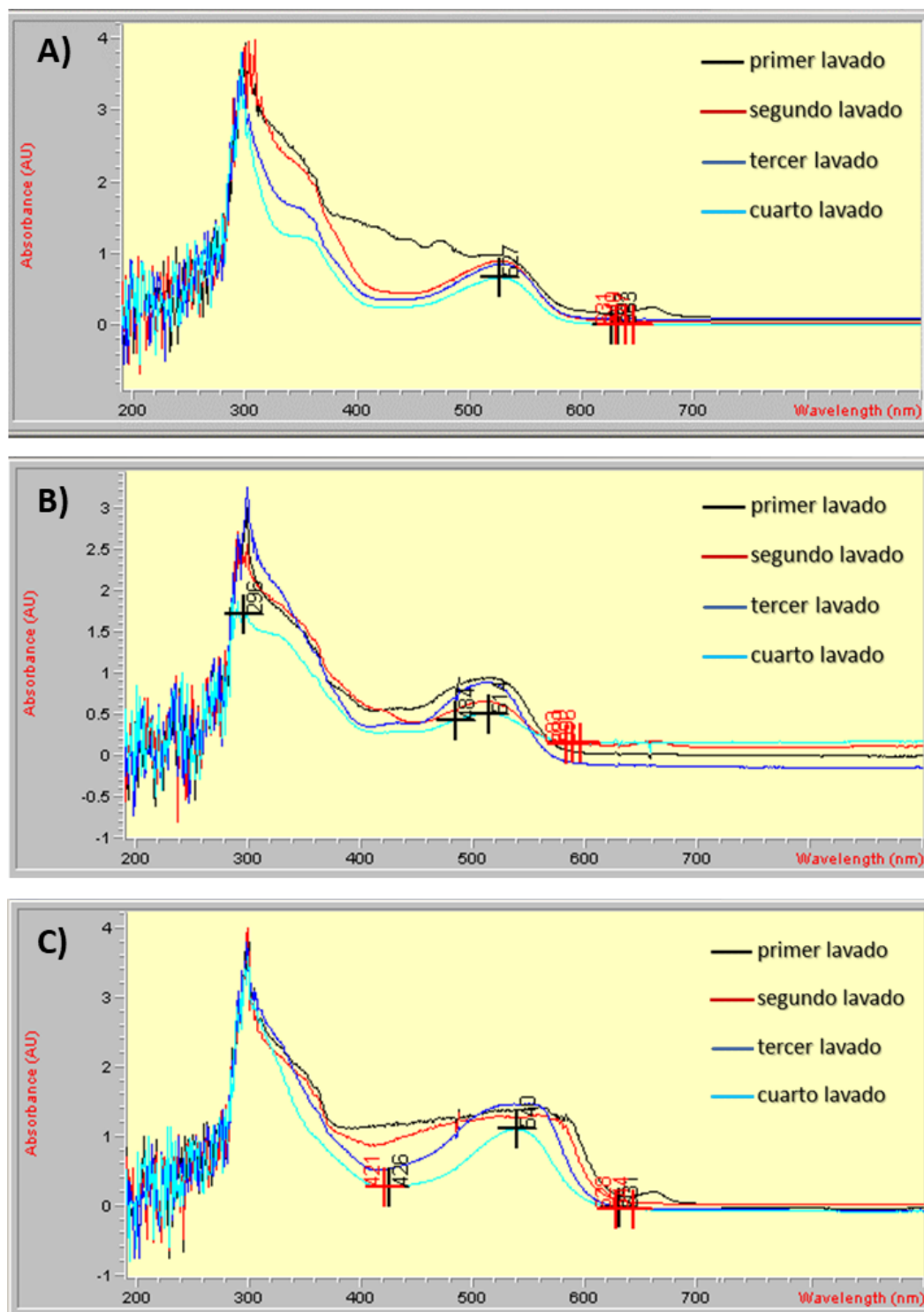


Figura 8. Espectros de absorción de lavados de etil acetato en el proceso de extracción de antocianinas a partir de frutos de A) Zarzamora, B) Fresa y C) Cáscara de uva de vino.

7.3 Aislamiento de Extractos Ricos en Antocianinas

El extracto acuoso obtenido después de los lavados de etil acetato se sometió a un proceso de cromatografía en columna utilizando las resinas poliméricas Amberlite XAD-7 y Sephadex HL-20 seriadas.

De manera similar a otros estudios que utilizaron dicho sistema de cromatografía en columna abierta, una vez cargadas las muestras a la resina Amberlite XAD-7 se hicieron pasar dos litros de agua lo cual permitió la elución de sales, hidratos de carbono, fibras solubles y proteínas mientras que las antocianinas permanecieron adheridas a la resina (Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010; He y Giusti, 2011; Rohm y Haas, 2000; Zhang *et al.*, 2008). En la Figura 9 se muestra la elución de las antocianinas de la columna Amberlite-XAD7 provenientes de diferentes extractos frutales con etanol acidificado al 0.3 % con ácido trifluoroacético (ATF). Se observa un solo pico máximo de absorción a los 520 nm, absorbancia propia de las antocianinas, en todos los casos. Las antocianinas de los tres extractos eluyeron entre los 110 mL y 170 mL. Lo anterior indica que las antocianinas propias de cada fruto tienen afinidades similares a la resina Amberlite XAD-7. Resultados similares de elución se han observado para antocianinas de extractos de frambuesa roja, grosella negra y aronia (Zhang *et al.*, 2008, Kraemer-Schafhalter *et al.*, 1998 y Kähkönen *et al.*, 2003). A pesar de que se utilizaron diferentes tipos de frutillas hubo una buena eficiencia en el aislamiento de antocianinas. Sugiriendo así que Amberlite XAD-7 posee una gran afinidad por las antocianinas.

En la Figura 10 se observa que los extractos obtenidos después de la resina Amberlite XAD-7 consistieron principalmente en antocianinas debido a que los extractos presentaron el perfil espectrofotométrico característico de las antocianinas con dos picos de absorbancia máxima a 280 nm y 520 nm (línea negra).

Los extractos obtenidos de la columna Amberlite-XAD7 se cargaron posteriormente a la columna Sephadex LH-20. Debido a sus propiedades de separación por peso molecular y polaridad. En la gráfica de elución se aprecian diferentes fracciones de antocianinas de diferentes fuentes frutales (Figura 11). Donde se puede ver que las muestras de zarzamora y fresa tuvieron tres y dos fracciones respectivamente, mientras que la cáscara de uva de vino tuvo mayor número de fracciones (cinco fracciones). Las diferentes fracciones correspondientes a cada muestra indican que hay antocianinas diferentes en la misma mezcla de extractos frutales. En ambos casos de las mezclas de antocianinas de zarzamora y fresa (con un menor número de fracciones) la última fracción fue la más abundante. A comparación con la mezcla de antocianinas de cáscara de uva de vino donde las fracciones 2, 3 y 4 fueron las más abundantes. Estos resultados comprueban que la resina Sephadex LH-20 fue efectiva para separar antocianinas individuales de zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino al igual que se ha reportado para la frambuesa roja y mora azul (Wang *et al.*, 2014 y Zhang *et al.*, 2008). Esta individualidad de las antocianinas se puede observar en el espectro de absorción que se realizó entre los 200 nm y 700 nm de la fracción más abundante para cada extracto de fruta eludida de la columna Sephadex LH-20 (línea roja) (Figura 10). Como se encontró en el trabajo de Wrolstad *et al.*, donde caracteriza el espectro de absorción de las antocianinas a través de espectrofotometría Uv-vis. Por lo tanto, de acuerdo a estudios previos se sugiere que en el extracto de zarzamora la antocianina más abundante fue la cianidina-3-glucósido, para el extracto de fresa la pelargonididina-3-glucósido y para el extracto de cáscara de uva de vino la malvidina-3-glucósido.

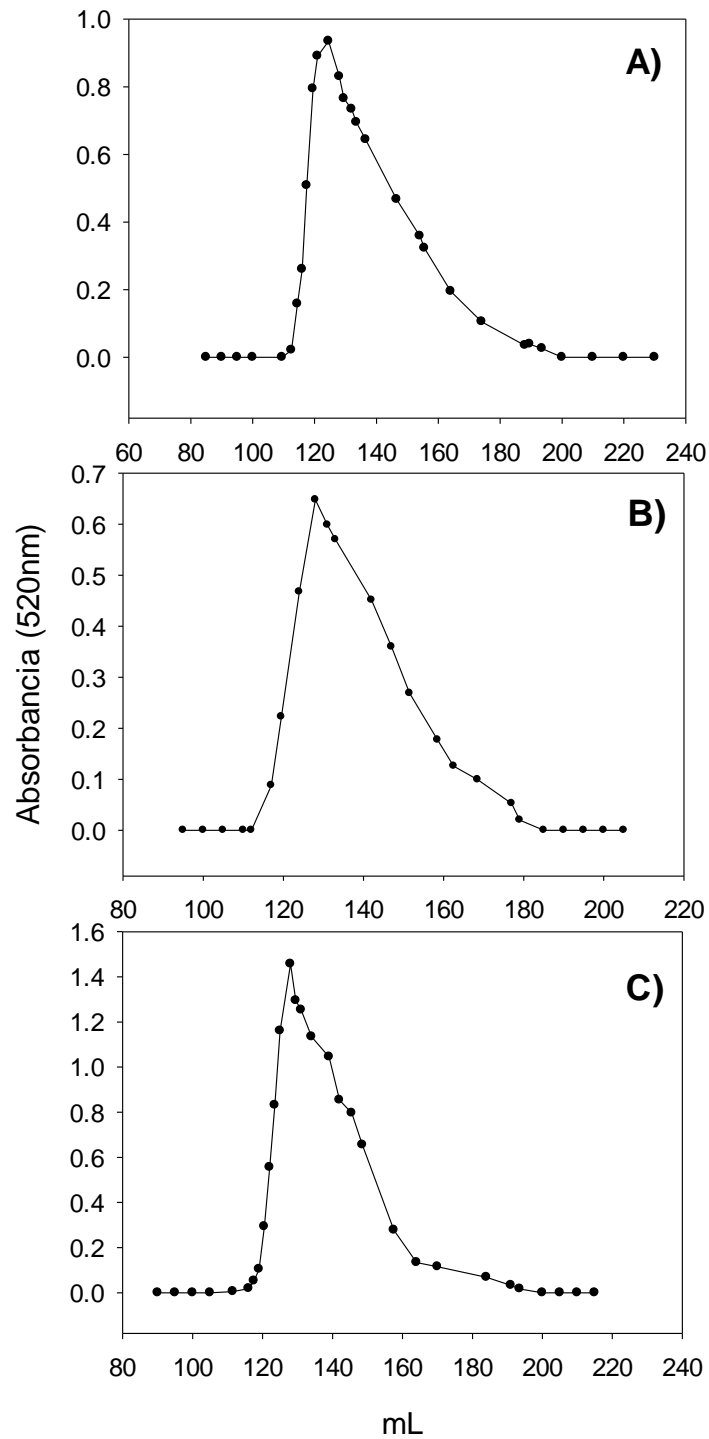


Figura 9. Gráfica de elución de antocianinas de la columna Amberlite XAD-7 a partir de extractos de diferentes matrices frutales (A) Zarzamora, B) Fresa y C) Uva).

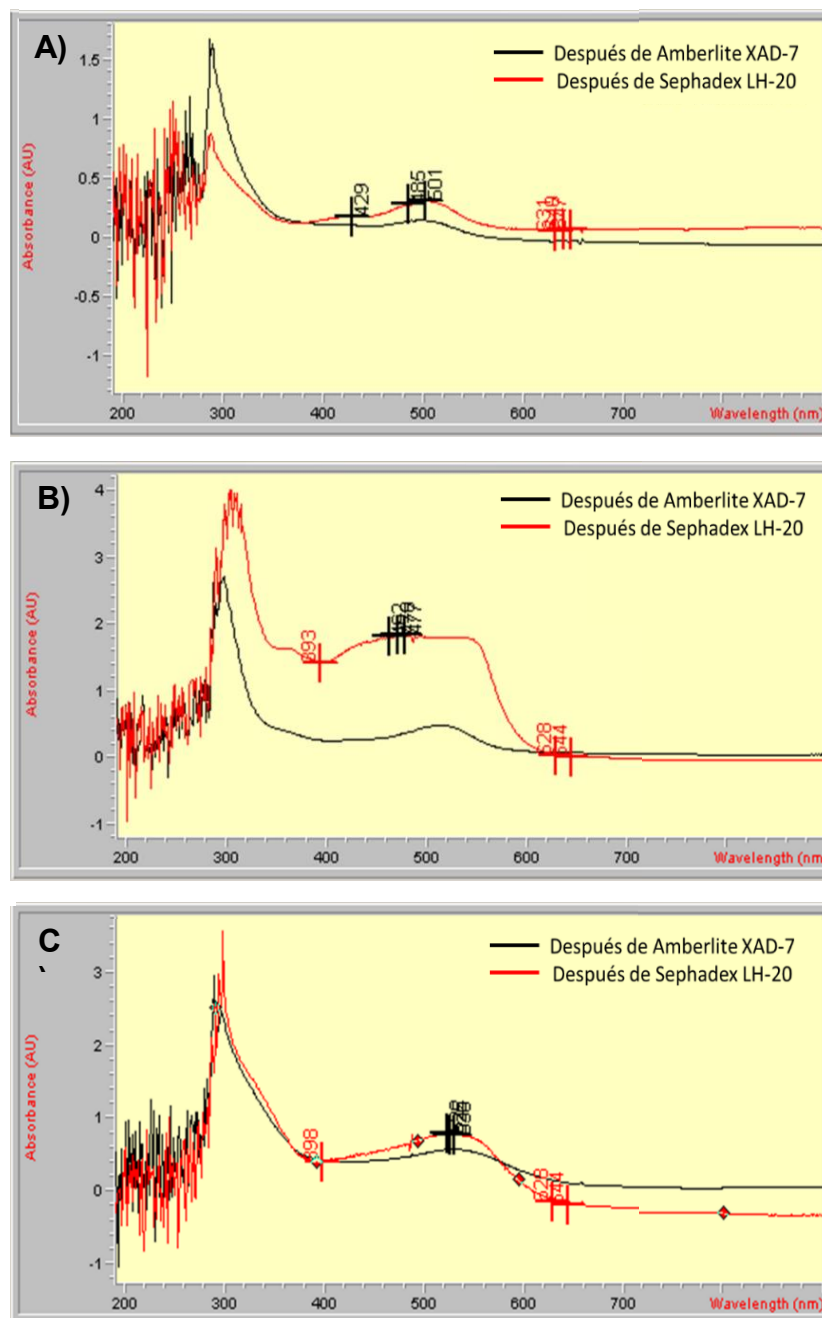


Figura 10. Espectros de absorción de antocianinas eluidas después de Amberlite XAD-7 y Sephadex LH-20 a partir de diferentes matrices frutales (A) Zazzamora, B) Fresa y C) Uva). La línea negra representa la obtención de antocianinas (principalmente) mediante Amberlite XAD-7 para cada fruta debido a que se observa el perfil espectrofotométrico característico de estos compuestos (picos máximo a los 280 nm y 520 nm). Y la línea roja representa las antocianinas más abundantes de cada extracto acuoso mediante Sephadex LH-20.

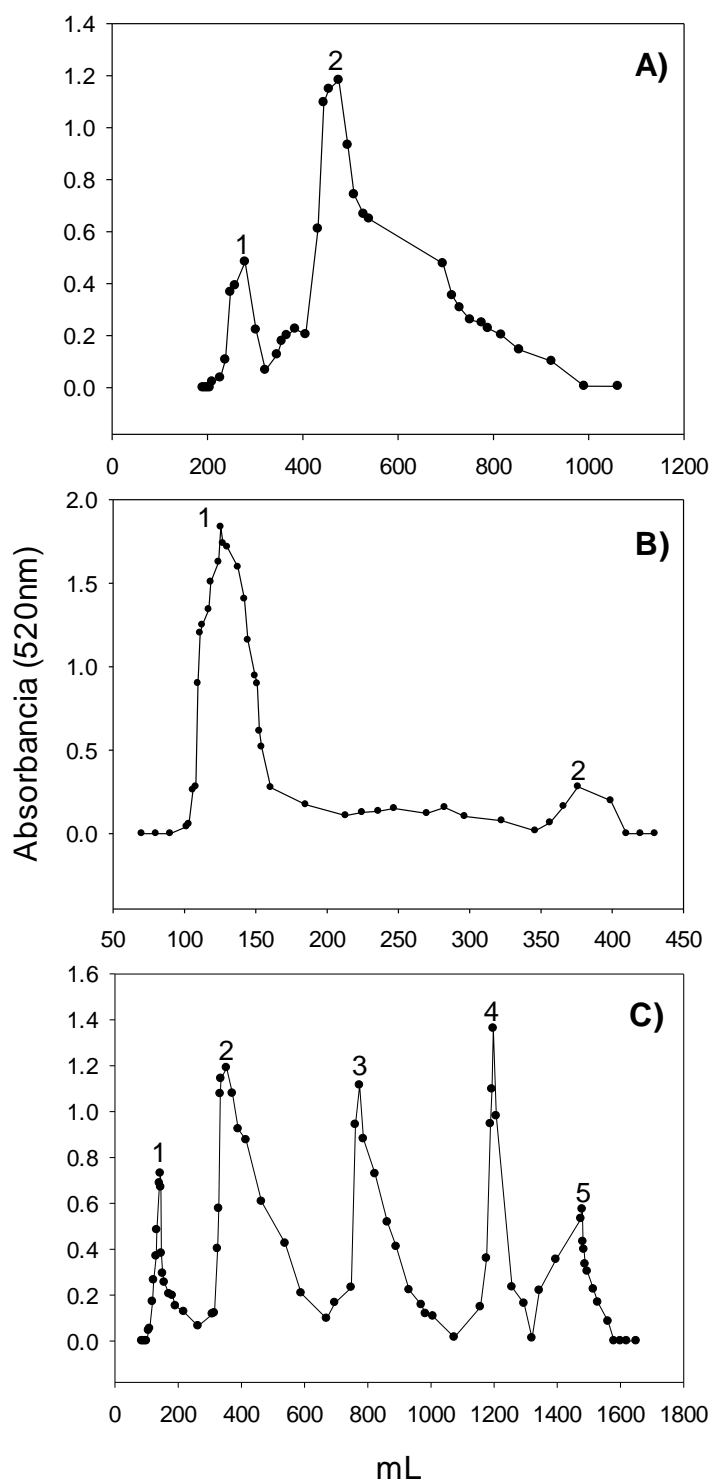


Figura 11. Gráfica de elución de antocianinas de la columna Sephadex LH-20 a partir de diferentes matrices frutales (A) Zarzamora, B) Fresa y C) Uva).

7.4 Estabilidad Gastrointestinal de Compuestos Fenólicos Totales

Los valores de estabilidad representan la proporción de compuestos fenólicos totales después de las digestiones gástricas y gastrointestinales en relación al contenido inicial de fenoles (Figura 12). Para la determinación de fenoles totales en los extractos de digestión se restaron los fenoles añadidos a partir de los medios enzimáticos. El contenido inicial de fenoles en la fracción de antocianinas aisladas de zarzamora fue de 22.20 ± 0.47 mcg/mL y 18.69 ± 0.86 mcg/mL para las digestiones gástricas y gastrointestinales, respectivamente. En el aislado de antocianinas de fresa fue de 13.64 ± 1.88 mcg/mL y 9.46 ± 0.82 mcg/mL para las digestiones gástricas y gastrointestinales, respectivamente. Y en el aislado de antocianinas de cáscara de uva de vino fue de 9.68 ± 1.86 mcg/mL y 9.03 ± 0.97 mcg/mL para las digestiones gástricas y gastrointestinales, respectivamente.

La estabilidad gástrica de los compuestos fenólicos de zarzamora varió 55.6 a 91.2 %, para los de fresa varió de 0.0 a 25.7 % y para los de cáscara de uva de vino varió de 8.5 a 111.7 %. La disminución del contenido fenólico tras la digestión gástrica también fue encontrado en el trabajo realizado por Liang *et al.* (2012), aunque el aumento observado en el contenido fenólico de la fracción de antocianinas aisladas de cáscara de uva de vino podría deberse a que estas presentan una amplia y compleja variedad de fenoles además de antocianinas. Los fenoles de zarzamora y cáscara de uva de vino mostraron mayor estabilidad gástrica en comparación con la fresa en todos los tratamientos, con excepción de las digestiones con calcio en donde las antocianinas de cáscara de uva de vino presentaron la menor estabilidad. En cuanto al efecto de los iones, la estabilidad de los compuestos fenólicos de zarzamora y cáscara de uva de vino se vió favorecida por su presencia en comparación con las digestiones control, con excepción del magnesio y el calcio para zarzamora y uva, respectivamente. En cambio la estabilidad gástrica de los fenoles de fresa no se vió favorecida por la

presencia de iones, incluso en las digestiones gástricas con magnesio no se detectaron fenoles.

La estabilidad gastrointestinal de los compuestos fenólicos de zarzamora varió 79.9 a 140.7 %, para los de fresa varió de 89.9 a 125.3 % y para los de cáscara de uva de vino varió de 70.5 a 153.2 %. Los compuestos fenólicos de fresa presentaron la mayor estabilidad en la digestiones sin iones, con hierro y zinc, seguidos por los fenoles de cáscara de uva de vino y sucesivamente por los de zarzamora, con excepción del tratamiento con zinc donde no hubo diferencias en la estabilidad de los fenoles de zarzamora y cáscara de uva de vino. Contrariamente en las digestiones con magnesio y calcio las antocianinas de fresa fueron las que presentaron una menor estabilidad.

Los compuestos fenólicos de zarzamora presentaron una estabilidad gastrointestinal superior al 100% y mayor que el control en las digestiones con magnesio y calcio. Mientras que en las digestiones sin iones, hierro y zinc su estabilidad vario poco (79.9 – 95.8 %). Para los fenoles de fresa no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, a pesar de ello su estabilidad varió de 89.9 – 125.3 % siendo el magnesio y el hierro los que causaron la mayor y menor estabilidad gastrointestinal, respectivamente. La estabilidad gastrointestinal de los compuestos fenólicos de cáscara de uva de vino no varió significativamente entre los tratamientos (70.5 – 153.2 %) con excepción de la digestión con zinc en donde se presentó una estabilidad significativamente menor a lo observado en el resto de los tratamientos.

El incremento del contenido fenólico del medio gástrico al gastrointestinal se podría explicar por la posible fisión de las antocianinas en el medio alcalino-básico. Concordando con otros estudios, donde el incremento de estos compuestos podría deberse a la separación de los diferentes anillos de la estructura química de las antocianinas generándose así fluroaldehídos, ácidos fenólicos distintos para cada tipo de antocianina (ácido protocatecuico de cianidina-3-glucósido; ácido 4-hidroxibenzoico de pelargonidina-3-glucósido; y

ácido vainílico de malvidina-3-glucósido) y otros compuestos fenólicos de transformación como los caracterizados por Liang *et al.* (2012) (Bouayed *et al.*, 2011; Sadilova *et al.*, 2007). Este aumento en el contenido de fenoles del medio gástrico al gastrointestinal en otros estudios varió aproximadamente del 10.0 al 87.9 % (Bouayed *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2012). El incremento de sólo el 10.0 % pudo deberse a la baja cantidad inicial de antocianinas digeridas en frutos de manzana, reportado por Bouayed *et al.*, (2011).

7.5 Estabilidad Gastrointestinal de Antocianinas Totales

Los valores de estabilidad representan la proporción de antocianinas totales después de las digestiones gástricas y gastrointestinales en relación al contenido inicial de antocianinas (Figura 13). El contenido inicial de las antocianinas de zarzamora fue de 1681.02 ± 51.16 mcg/L y 1074.29 ± 25.81 para las digestiones gástricas y gastrointestinales, respectivamente. Para las antocianinas de fresa fue de 669.64 ± 70.99 mcg/L y 541.74 ± 96.52 mcg/L para las digestiones gástricas y gastrointestinales, respectivamente. Y por último para las antocianinas de cáscara de uva de vino fue 475.65 ± 47.65 mcg/L y 449.16 ± 15.25 mcg/L para las digestiones gástricas y gastrointestinales, respectivamente.

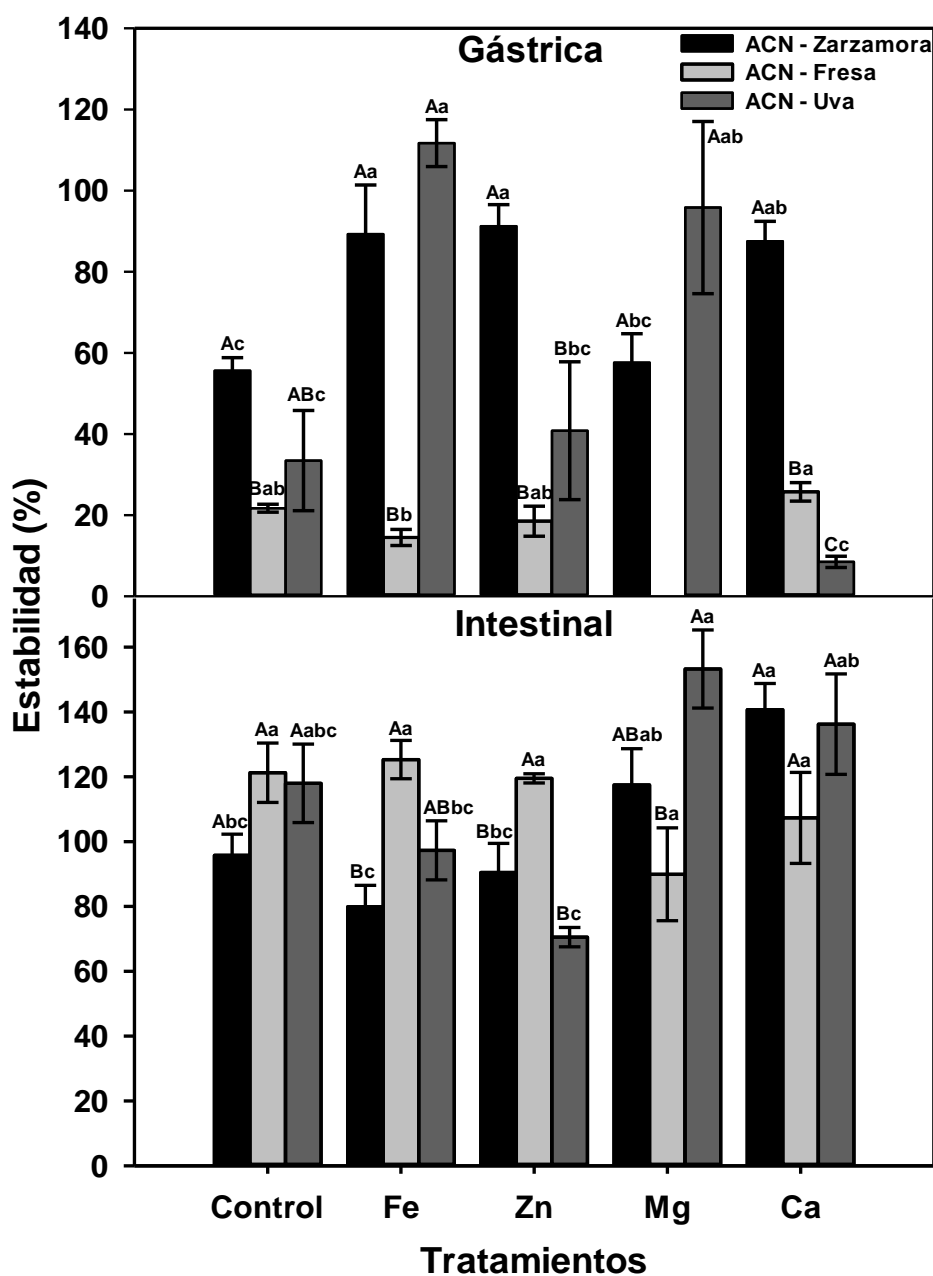


Figura 12. Estabilidad gástrica y gastrointestinal *in vitro* de los compuestos fenólicos totales presentes en los extractos de digestión gástrica y gastrointestinal de las antocianinas aisladas de zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino en presencia y ausencia de iones divalentes (hierro, zinc, magnesio y calcio). Los datos representan la media de cuatro mediciones independientes \pm el error estándar. Las barras que pertenecen al mismo tratamiento y las que pertenecen a la misma antocianina son conectadas con letras mayúsculas y minúsculas, respectivamente, siendo las desiguales significativamente diferentes ($p < 0.05$).

En general, el contenido de las antocianinas se vio ligeramente disminuido o aumentado después de las digestiones gástricas. La estabilidad gástrica de las antocianinas de zarzamora varió de 79 % a 90.4 %, para las de fresa varió de 70.8 % a 102.8 % y para las de cáscara de uva de vino varió de 81.5 % a 143.5 %. Las antocianinas de zarzamora y fresa no mostraron diferencias significativas en su estabilidad al mezclarse con iones en comparación con el control. Pero distintivamente las antocianinas de cáscara de uva de vino digeridas con zinc y magnesio presentaron una estabilidad mayor (30.7 % a 42.8 % más) en el medio gástrico en comparación con el control (digestión sin iones). La alta recuperación del contenido de antocianinas totales después de la digestión gástrica coincide con lo reportado previamente tras la digestión gástrica de moras, granada, frambuesa y manzana roja (54.6 – 107 %) (Bouayed *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2012; McDougall *et al.*, 2005; Sengul *et al.*, 2014). Los valores altos de estabilidad gástrica pueden explicarse debido a que la estabilidad de las antocianinas se ve favorecida por el medio ácido. Además de que el poco efecto observado de los iones divalentes en la estabilidad gástrica de las antocianinas puede deberse a que su estabilidad se explica en mayor medida al pH ácido de esta etapa que por la presencia de otros componentes alimentarios.

En cuanto a las digestiones gastrointestinales las antocianinas de las diferentes fuentes se vieron disminuidas en mayor medida que en las digestiones gástricas. La estabilidad gastrointestinal para las antocianinas de las diferentes fuentes siguió el orden de fresa > zarzamora > uva (50.0 – 85.7 %; 45.9 – 66.4 %; 28.6 – 44.6 %, respectivamente). Lo anterior no se observó en las digestiones con magnesio. Esta disminución en el medio gastrointestinal se debe a que las antocianinas pierden estabilidad en medios alcalinos – básicos (Março *et al.*, 2010). Los porcentajes de recuperación encontrados en este estudio concuerdan con lo reportado para antocianinas de granadas y frambuesas (recuperación del 39.8 al 61.9 %) (McDougall *et al.*, 2005). En contraste, en otros estudios han reportado una nula o baja (4.6 %) recuperación de antocianinas después de la

digestión gastrointestinal (Bouayed *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2012). Sin embargo, la baja recuperación en dichos estudios puede deberse a la concentración menor de antocianinas en los frutos evaluados (manzana, moras) o a la presencia de otros compuestos propios de la matriz alimentaria que pudieron interferir con la detección de antocianinas.

Las antocianinas que son compuestos coloridos a pH ácidos pierden estabilidad cuando su catión flavilio es transformado a chalconas y pseudobases carbinol debido al pH de este medio gastrointestinal resultando una predominancia de las conformaciones incoloras de estos compuestos (Liang *et al.*, 2012). Este primer proceso de metabolismo de antocianinas hacia chalconas es seguida por la ruptura de la estructura de las antocianinas concordando con el incremento del contenido fenólico observado en este estudio.

Los iones tuvieron un efecto diferencial en la estabilidad gastrointestinal de las antocianinas de las diferentes fuentes. Estos favorecieron la estabilidad gastrointestinal de las antocianinas de zarzamora (aumento de 4.7% a 21.0 %) en comparación con las digestiones sin iones, siendo el magnesio el único que indujo diferencias significativas. Para las antocianinas de fresa su mayor y menor estabilidad gastrointestinal se observó en las digestiones con hierro y magnesio, respectivamente, sin observarse diferencias significativas con respecto a los otros tratamientos y el control sin iones. Contrariamente para las antocianinas de cáscara de uva de vino, el magnesio y el calcio favorecieron la estabilidad gastrointestinal (de 21.7 % a 38.9 % mayor estabilidad) en comparación con la digestión control y las digestiones con hierro y zinc, aunque esta tendencia no fue significativa. El efecto diferencial de los iones en la estabilidad de cada tipo de antocianina puede deberse a que la estructura química de las antocianinas determina la interacción con los iones divalentes durante la digestión gastrointestinal. Tal y como se ha visto en algunos estudios donde han sugerido que los grupos hidroxilos libres del anillo B (diferentes número en cada tipo de antocianina) interactúan con los iones formando metaloantocianinas (Tachibana

et al., 2014). Lo cual explica el por qué en este estudio las antocianinas de zarzamora, en las que predomina la cianidina-3-glucósido, el efecto benéfico de los iones en la estabilidad gastrointestinal fue más claro que para las antocianinas de fresa (pelargonidina-3-glucósido) y cáscara de uva de vino (malvidina-3-glucósido), ya que estas últimas sólo cuentan con un grupo OH en su estructura disponible para reacciones con iones, mientras que la cianidina tiene dos. El efecto estabilizador de los iones o metales sobre la estabilidad de las antocianinas se ha observado en algunos alimentos. Por ejemplo, se ha sugerido que el hierro y el calcio estabilizan la cianidina-3-glucósido del maíz criollo azul (Cavalcanti *et al.*, 2011; Tachibana *et al.*, 2014) Mientras que en el vino, el hierro estabiliza a diferentes antocianinas durante el proceso de fermentación, principalmente a la malvidina-3-glucósido, en un proceso que se conoce como co-pigmentación (Kunsági-Maté *et al.*, 2008).

7.6 Estimación de la Actividad Antioxidante

Las pruebas para medir la capacidad antioxidante nos permiten observar una simulación de la relación de la habilidad de evitar el daño oxidativo generado por radicales libres (ROS) en los fluidos biológicos. Estos ensayos generan una coloración intensa en la muestra tras un cambio generado por alguna reacción (Benzie *et al.*, 1996).

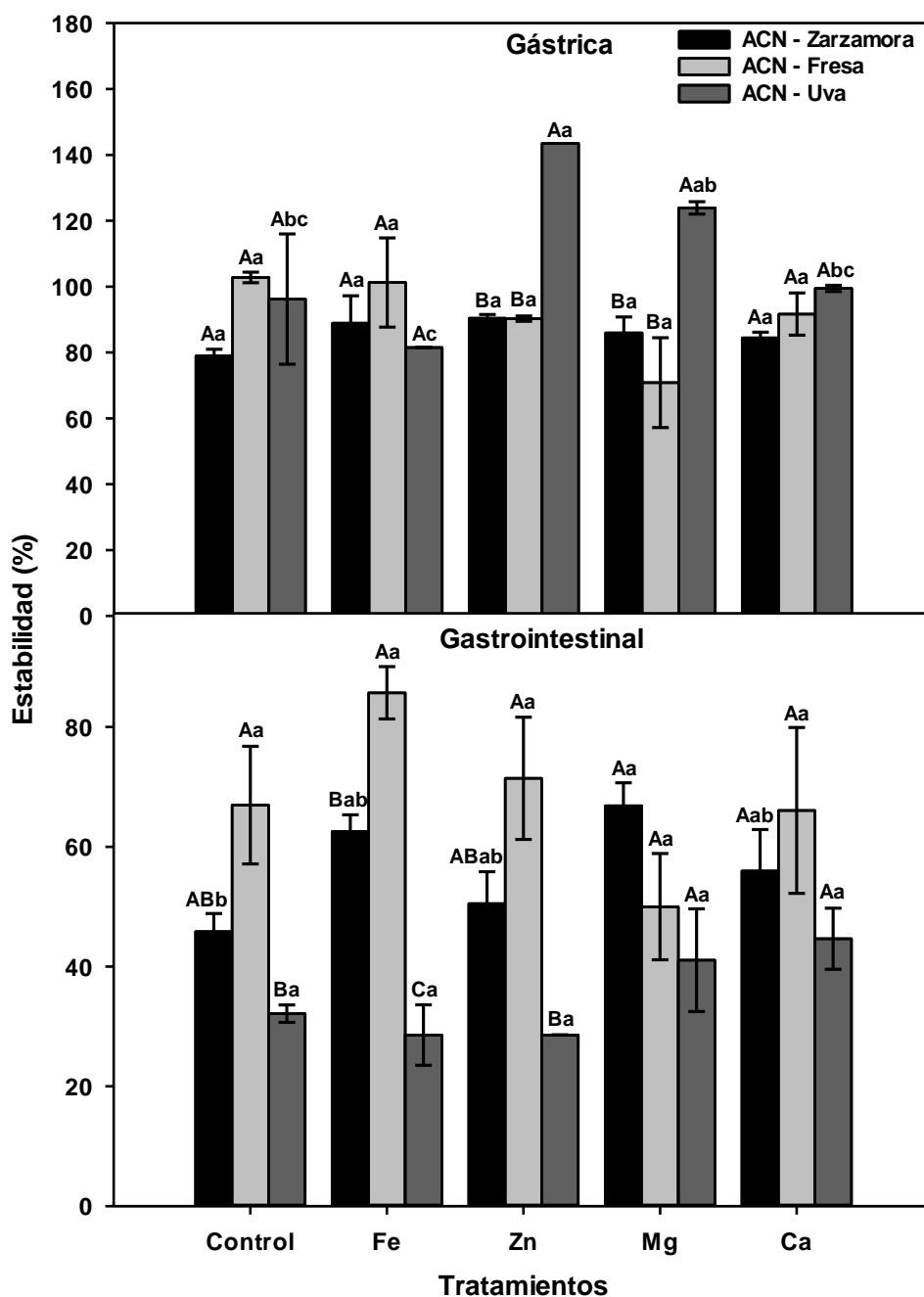


Figura 13. Estabilidad gástrica y gastrointestinal *in vitro* de antocianinas de zarzamora fresa, y cáscara de uva de vino en presencia y ausencia de iones divalentes (hierro, zinc, magnesio y calcio). Los datos representan la media de cuatro mediciones independientes \pm el error estándar. Las barras que pertenecen al mismo tratamiento y las que pertenecen a la misma antocianina son conectadas con letras mayúsculas y minúsculas, respectivamente, siendo las desiguales significativamente diferentes.

7.5.1 FRAP

La actividad antioxidante bajo el método FRAP considera la reacción colorimétrica que se genera cuando la forma férrica unida a tripiridilhidrazina (Fe^{3+} - TPTZ) se reduce a la forma ferrosa (Fe^{2+} - TPTZ) en condiciones de acidez (Benzie y Strain, 1996).

Las antocianinas de zarzamora presentaron una actividad antioxidante significativamente mayor que las antocianinas de fresa y uva (1.8 - 4 veces más) antes y después de la digestión gástrica. Esta tendencia se observó bajo todos los tratamientos. La actividad antioxidante de las antocianinas de fresa y uva no mostraron diferencias significativas entre ellas, con excepción de la digestión con magnesio donde las antocianinas de fresa tuvieron una actividad antioxidante significativamente menor que las antocianinas de uva (40.8 % menos).

Todas las antocianinas aumentaron significativamente su actividad antioxidante en las digestiones gástricas con hierro (29.7 % - 35.4 % más) (Figura 14). La digestión gástrica aumentó la actividad antioxidante de las antocianinas de zarzamora sin haber diferencias significativas entre las digestiones sin iones, zinc, magnesio y calcio.

Durante la digestión gastrointestinal las antocianinas de zarzamora siguen presentando al igual que la digestión gástrica una actividad antioxidante significativamente mayor que las antocianinas de fresa y uva (1 – 2.5 veces más). La tendencia se presentó para todos los tratamientos. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la actividad antioxidante de las antocianinas de fresa y uva.

En cuanto al efecto de los iones, todas las antocianinas disminuyeron su actividad antioxidante durante la digestión gastrointestinal con hierro en comparación con la digestión control, siendo sólo significativo para las antocianinas de fresa. Para las antocianinas de zarzamora y uva no se observaron diferencias significativas

entre las digestiones con los iones de zinc, magnesio y calcio en comparación con el control. Las antocianinas de fresa digeridas con zinc y calcio también disminuyeron su actividad antioxidante, mientras que en el magnesio no se encontraron diferencias significativas respecto a las digestiones inicial y control. Las antocianinas de uva no mostraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos.

Similar a lo encontrado en este estudio, Pantedelis *et al.* (2007) encontraron que extractos de zarzamora tuvieron una actividad antioxidante mayor en comparación con extractos de otros frutos (frambuesas, grosella roja y ciruelas de cornejo macho) (Pantedelis *et al.*, 2007). Esta tendencia pudo deberse también a que el contenido de antocianinas en el aislado de zarzamora fue mayor al contenido en los aislados de fresa y cáscara de uva de vino. Al realizar un análisis de correlación, en este estudio la actividad antioxidante se asoció positivamente al contenido de antocianinas ($r^2 = 0.8106$, 0.3885 y 0.5020 para zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino, respectivamente) y negativamente al contenido de compuestos fenólicos totales con valores de correlación bajos ($r = 0.3101$, 0.4618 y 0.1035 para zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino, respectivamente). Similarmente Kalt *et al.*, (1999) encontró en otras frutillas una relación lineal mayor en antocianinas que en el contenido fenólico, siendo $r = 0.900$ y $R = 0.830$, respectivamente. En otros estudios la actividad antioxidante se asocia más al contenido de compuestos fenólicos que al de antocianinas, antes o después de un proceso digestivo (Bouayed *et al.*, 2011; Pantedelis *et al.*, 2007). Sin embargo Bouayed *et al.* (2011) no detectaron antocianinas después de la digestión de manzanas, lo cual puede deberse a la poca cantidad de estos compuestos que añadieron a la digestión. Por otro lado, los valores de actividad antioxidante fueron mayores en los extractos de digestión gástrica que en medio gastrointestinal. Esto puede deberse en parte al cambio en la conformación y degradación de las antocianinas pero también a que la reacción se lleva a cabo

bajo condiciones de acidez, por lo que puede reflejar en mejor medida la actividad antioxidante en el medio gástrico que el gastrointestinal.

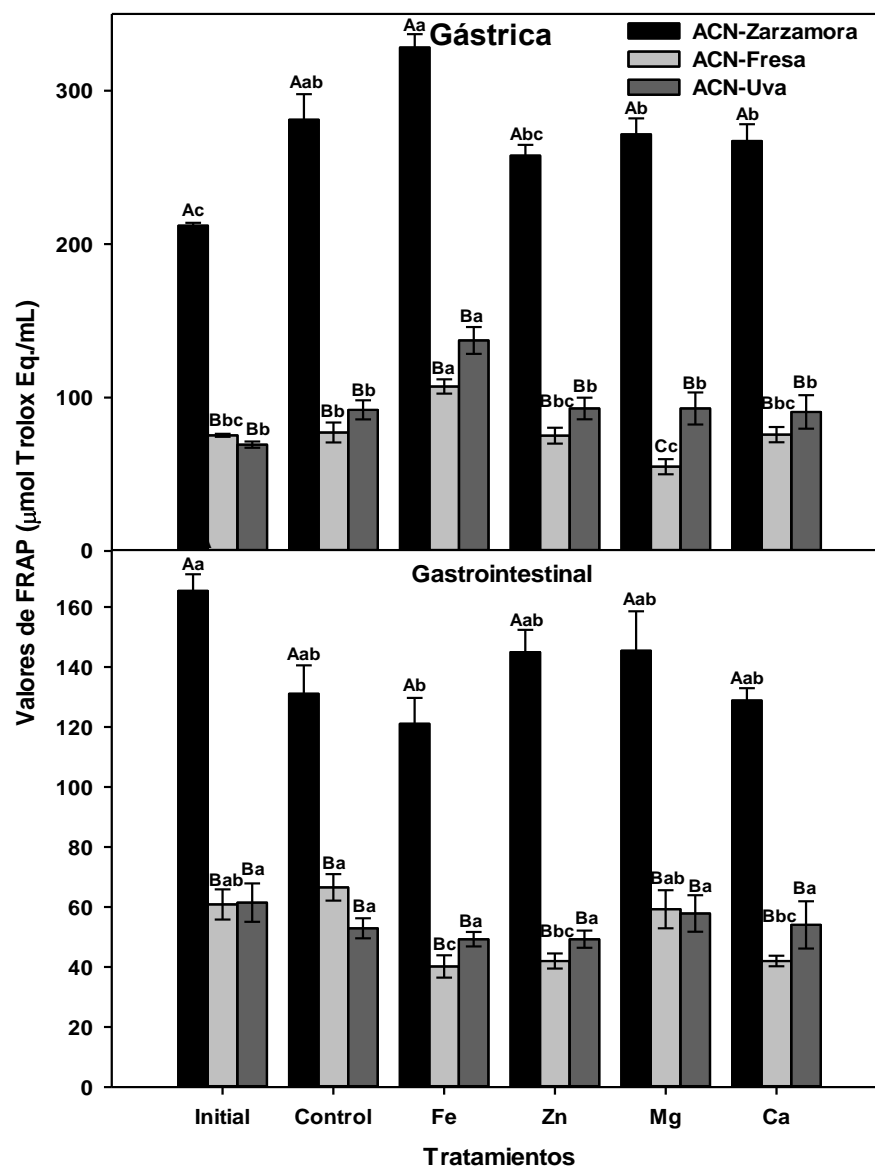


Figura 14. Capacidad antioxidante de antocianinas estimada por la prueba FRAP a partir de diferentes matrices frutales (zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino) sometidas a diferentes tratamientos con y sin iones divalentes de hierro, zinc, magnesio y calcio durante el proceso de digestión *in vitro*. Los datos representan la media de cuatro mediciones independientes \pm el error estándar. Las barras que pertenecen al mismo tratamiento y las que pertenecen a la misma antocianina son conectadas con letras mayúsculas y minúsculas, respectivamente, siendo las desiguales significativamente diferentes.

7.5.2 DPPH

El método DPPH involucra un radical alcalino que en presencia de un alto suministro de oxígeno forma hidroperóxidos y radicales de peróxido. Por lo tanto, la evaluación colorimétrica de la actividad antioxidante se basa en la reducción del radical DPPH en presencia de un antioxidante (Brand-Williams et al., 1995).

Al igual que para FRAP, en el ensayo de DPPH las antocianinas de zarzamora presentaron una actividad antioxidante significativamente mayor que las antocianinas de fresa y uva (3.9 veces más) tanto en los valores iniciales como en las digestiones bajo todos los tratamientos (Figura 15). Mientras que las antocianinas de fresa tuvieron una actividad antioxidante mayor que las antocianinas de uva antes de la digestión y después de la digestión gástrica control. Mientras que en las digestiones con iones las antocianinas de uva tuvieron una mayor actividad antioxidante que las de fresa.

Los iones disminuyeron la actividad antioxidante después de la digestión gástrica en comparación con el control, para todas las antocianinas. Las antocianinas de zarzamora tuvieron significativamente los valores más bajos con la digestión con magnesio, mientras que para la uva fue con el calcio.

Todas las antocianinas disminuyeron significativamente su actividad antioxidante después de la digestión gastrointestinal (2.5 – 4.7 veces menos) respecto a los valores iniciales (antes de la digestión). Las antocianinas de fresa perdieron totalmente su actividad antioxidante después de la digestión gastrointestinal. Mientras que las antocianinas de zarzamora sólo perdieron totalmente su actividad antioxidante al digerirse con el hierro. Para las antocianinas de uva la pérdida total de su actividad antioxidante fue en la digestión control y en la digestión con magnesio.

Las antocianinas de zarzamora tuvieron una actividad antioxidante significativamente mayor (26 % al 27 %) que las antocianinas de fresa y uva en

las muestras iniciales sin digerir. No hubo diferencias significativas en la actividad antioxidante de las antocianinas de zarzamora control en comparación con las digestiones con los iones de zinc, magnesio y calcio. Las antocianinas de uva tuvieron una actividad antioxidante significativamente mayor 36.7 % y 29.5 % al digerirse con zinc y calcio, respectivamente, en comparación con las antocianinas de zarzamora.

A pesar de que la actividad antioxidante evaluada por DPPH no muestra una tendencia clara, se puede ver que la actividad antioxidante fue mayor en la fase gástrica que en la intestinal. En otros estudios también se ha reportado una disminución progresiva de la actividad antioxidante entre el medio gástrico y gastrointestinal (Liang *et al.*, 2012). Sin embargo, es difícil hacer una comparación debido a que en la mayoría de los estudios se digieren frutos complejos que contienen otros antioxidantes diferentes a las antocianinas. Esto pudo haber sido por los cambios que sufren las antocianinas en su estructura química tras su paso por las condiciones ácidas a neutras teniendo un alto contenido fenólico en la fase gastrointestinal (Liang *et al.*, 2012; Março *et al.*, 2010). Sin embargo en otro estudio donde utilizaron la cáscara y semillas de uva de vino de Brasil se vio que la alta actividad antioxidante fue debida a la alto contenido fenólico (Baiano y Terracone, 2011).

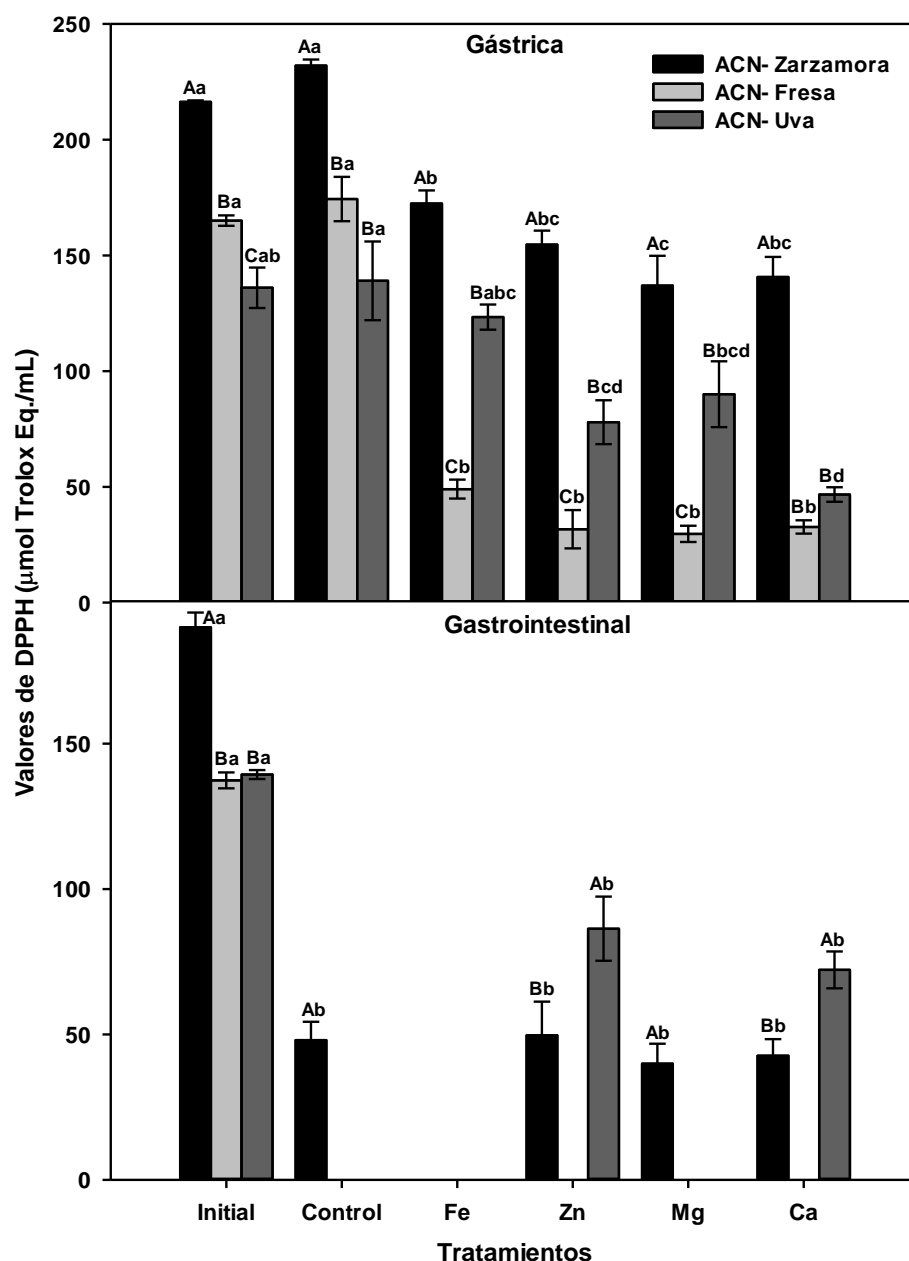


Figura 15. Capacidad antioxidante de antocianinas aisladas estimada por la prueba DPPH a partir de diferentes matrices frutales (zarzamora, fresa y cáscara de uva de vino) sometidas a diferentes tratamientos con y sin iones divalentes de hierro, zinc, magnesio y calcio después de un proceso de digestión gástrico y gastrointestinal *in vitro*. Los datos representan la media de cuatro mediciones independientes \pm el error estándar. Las barras que pertenecen al mismo tratamiento y las que pertenecen a la misma antocianina son conectadas con letras mayúsculas y minúsculas, respectivamente, siendo las desiguales significativamente diferentes.

8. CONCLUSIONES

La literatura y la química nos propone que las antocianinas se pueden unir a iones y mejorar su estabilidad, sin embargo, no puede haber una generalización para todas las antocianinas, ya que estas muestran diferencias en su estructura y reactividad químicas al igual que los iones. Aunque el aumento en la estabilidad de las antocianinas se ha observado en tratamientos térmicos y de fermentación, este es el primer reporte sobre el efecto de los iones en la estabilidad gastrointestinal de antocianinas. Los resultados de este estudio sugieren que si se quisiera diseñar un producto alimenticio a partir de zarzamora se podría añadir zinc y magnesio para que las antocianinas se mantengan estables durante el proceso gastrointestinal al ser consumido. Para un producto derivado de fresa se podría agregar hierro y para uno con uva se podría adicionar magnesio y calcio.

Los diferentes resultados encontrados en la actividad antioxidante se debe a que las pruebas son en base a diferentes reacciones. El FRAP se basa en una reducción de grupos de oxígeno y el DPPH se basa en una donación de hidrogenos, por lo cual no esperaríamos una tendencia igual o similar entre ambos ensayos. La variación de la actividad antioxidante se correlacionó positivamente con el contenido de antocianinas y negativamente con el contenido de compuestos fenólicos totales. La actividad que más se preservó después de la digestión gastrointestinal fue la de FRAP, lo cual cobra importancia ya que las reacciones de reducción de hierro se llevan a cabo de manera natural en el organismo. Los resultados de estas pruebas nos acercan a comprender la respuesta a nivel fisiológico, ya que las especies reactivas de oxígeno (ROS) se genera constantemente en nuestro cuerpo por metabolismo de las mitocondrias, entre ellas el peróxido de hidrógeno, aunado a la exposición constante de los radicales libres presentes en el ambiente.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Aal ESM, Young JC, Rabalski I. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54: 4696-4704.

Andrés-Lacueva C, Medina-Remon A, Llorach R, Urpi-Sarda M, Khan N, Chiva-Blanch G. Phenolic compounds: chemistry and occurrence in fruits and vegetables. En: De la Rosa LA, Alvarez-Parrilla E, González-Aguilar GA, editores. *Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry, nutritional value and stability*. 1ra edición. USA: Wiley-Blackwell; 2010.p.53-88.

Arts MJTJ, Haenen GRMM, Wilms LC, Beetstra SAJN, Heijnen CGM, Voss HP *et al*. Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50: 1184-1187.

Asada T, Koi Y, Arakawa R, Zhu F, Sadaoka M, Tamura H. Isolation techniques for anthocyanidin 3,5-diglucosides and their related chemicals using supramolecules technique, and two solid-phase extraction cartridges. *Journal of Chromatography A*. 2014; 1351: 21-28.

Ávila M, Hidalgo M, Sánchez-Moreno C, Pelaez C, Requena T, Pascual-Teresa S. Bioconversion of anthocyanin glycosides by *Byfidobacteria* and *Lactobacillus*. *Food Research International*. 2009; 42: 1453-1461.

Baiano A, Terracone C. Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant activities of seven table grape cultivars grown in the south of Italy based on chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59: 9815-9826.

Basu A, Rhone M, Lyons TJ. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition Reviews*. 2010; 68(3): 168-177.

Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical biochemistry*. 1996; 239: 70-76

Bermúdez-Soto MJ, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*. 2007; 102: 865-874.

Bey MB, Richard G, Meziant L, Fauconnier ML, Louaileche H. Effects of sun-drying on physicochemical characteristics, phenolic composition and in vitro antioxidant activity of dark fig varieties. *J Food Process Preserv*. 2016 Jul: 1-8.

Biehler E, Kaulmann A, Hoffmann L, Krause E, Bohn T. Dietary and host-related influencing carotenoid bioaccessibility from spinach (*Spinacia oleracea*). *Food Chemistry*. 2010; 125: 1328-1334.

Bouayed J, Hoffmann L, Bohn T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*. 2011; 128: 14-21.

Boulton R. The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2001; 52:2.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 1995; 28: 25-30.

Buran TJ, Sandhu AK, Li Z, Rock CR, Yang WW, Gu L. Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins. *Journal of Food Engineering*. 2014; 128: 167-173.

Byamukama R, Kiremire BT, Andersen ØM, Steigen A. Anthocyanins from fruits of *Rubus pinnatus* and *Rubus rigidus*. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2005; 18: 599-605.

Cabrita L, Andersen ØM. Anthocyanins in blue berries of *Vaccinium padifolium*. *Phytochemistry*. 1999; 52: 1693-1696.

Cantos E, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50: 5691-5696.

Cassidy A, Rogers G, Peterson J, Dwyer JT, Lin H, Jacques PF. Higher dietary anthocyanin and flavonol intakes are associated with anti-inflammatory effects in a population of US adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2015; 102:172-181.

Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández ML, Paéz-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. *Food Chemistry*. 2009; 113: 859-871.

Cavalcanti RN, Santos DT, Meireles MAA. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and foods systems—An overview. *Food Research International*. 2011; 44: 499–509.

Cervantes-Paz B, Yahia EM, Ornelas-Paz JJ, Victoria-Campos CI, Ibarra-Junquera V, Pérez-Martínez JD. Antioxidant activity and content of chlorophylls and carotenoids in raw and heat-processed Jalapeño peppers at intermediate stages of ripening. *Food Chemistry*. 2014; 146: 188–196.

Chandra A, Nair MG, Iezzoni AF. Isolation and stabilization of anthocyanins from tart cherries (*Prunus cerasus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1993; 41: 1062-1065.

Chandra A, Rana J, Li Y. Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49: 3515-3521.

Chang XL, Wang D, Chen BY, Feng YM, Wen SH, Zhan PY. Adsorption and desorption properties of macroporous resins for anthocyanins from the calyx extract of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012; 60: 2368-2376.

Chen PN, Chu SC, Chiou HL, Chiang CL, Yang CF, Hsieh YS. Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo. *Nutrition and cancer*. 2005; 53(2): 232-243.

Chun OK, Kim DO, Moon HY, Kang HG, Lee CY. Contribution of individual polyphenolics to total antioxidant capacity of plums. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51: 7240-7245.

Corte-Real J, Bertucci M, Soukoulis C, Desmarchelier C, Borel P, Richling E *et al.* Negative effects of divalent mineral cations on the bioaccessibility of carotenoids from plant food matrices and related physical properties of gastrointestinal fluids. *Food and function*. 2017; 8: 1008.

Cuevas-Rodriguez EO, Yousef GG, García-Saucedo PA, López-Medina J, Paredes-López O, Lila MA. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in wild and domesticated Mexican blackberries (*Rubus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010; 58(12): 7458-7464.

Dominguez JR, González T, Palo P, Cuerda-Correa EM. Removal of common pharmaceuticals present in surface waters by Amberlite XAD-7 acrylic-ester-resin: influence of pH and presence of other drugs. *Desalination*. 2011; 269: 231-238.

Dueñas M, Pérez-Alonso JJ, Santos-Buelga C, Escribano-Bailón T. Anthocyanin composition in fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008; 21: 107-115.

Duthie SJ. Berry phytochemicals, genomic stability and cancer: Evidence for chemoprotection at several stages in the carcinogenic process, Review. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007; 51: 665-674.

Escalante-Aburto A, Ramírez-Wong B, Torres-Chávez PI, Barrón-Hoyos JM, Figueroa-Cárdenas JD, López-Cervantes J. La nixtamalización y su efecto en el contenido de antocianinas de maíces pigmentados, una revisión. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 2013; 36(4): 429-437.

Faria A, Pestana D, Azevedo J, Martel F, Freitas V, Azevedo I *et al*. Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells - putative involvement of GLUT2. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2009; 53: 1430-1437.

Felgines C, Talavéra S, Gonthier MP, Texier O, Scalbert A, Lamaison JJ *et al*. Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *Journal of Nutrition*. 2003; 133: 1296-1301.

Felgines C, Texier O, Besson C, Vitaglione P, Lamaison JJ, Fogliano V *et al*. Influence of glucose on cyanidin 3-glucoside absorption in rats. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2008; 52: 959-964.

Fernandes I, Faria A, Calhau C, Freitas V, Mateus N. Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Function Alfoods*. 2013:

Ferreres F, Gil MI, Castañer M, Tomás-Barberán FA. Phenolic metabolites in red pigmented lettuce (*Lactuca sativa*). Changes with minimal processing and cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997; 45(11): 4249-4254.

Fossen T, Cabrita L, Andersen OM. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*. 1998; 63(4): 435-440.

Fossen T, Rayyan S, Andersen OM. Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols. *Phytochemistry*. 2004; 65: 1421-1428.

Frøytlog C, Slimestad R, Andersen ØM. Combination of chromatographic techniques for the preparative isolation of anthocyanins - applied on blackcurrant (*Ribes nigrum*) fruits. *Journal of Chromatography A*. 1998; 825: 89-95.

Gavrilova V, Kajdžanoska M, Gjamovski V, Stefova M. Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLC-DAD-ESI-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59: 4009-4018.

Guo H, Ling W. The update of anthocyanins on obesity and type 2 diabetes: Experimental evidence and clinical perspectives. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2015.

He J, Giusti MM. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annual review of food science and technology*. 2010; 163-187.

He J, Giusti MM. High-purity isolation of anthocyanins mixtures from fruits and vegetables - A novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography. *Journal of Chromatography. A*. 2011; 1218: 7914-7922.

Hollands W, Brett GM, Radreau P, Saha S, Birgit, T, Bennett RN. Processing blackcurrants dramatically reduces the content and does not enhance the urinary yield of anthocyanins in human subjects. *Food Chemistry*. 2008; 108: 869–878.

Jones RB. Effects of postharvest handling conditions and cooking on anthocyanin, lycopene, and glucosinolate content and bioavailability in fruits and vegetables. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 2007; 35: 219—227.

Juadjur A, Winterhalter P. Development of a novel adsorptive membrane chromatographic method for the fractionation of polyphenols from bilberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012; 60: 2427-2433.

Kammerer D, Kljusuric JG, Carle R, Schieber A. Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Mitos) using a polymeric adsorber resin. *The Journal of Food Research and Technology*. 2005; 220: 431-437.

Kamonpatana K, Giusti MM, Chitchumroonchokchai C, MorenoCruz M, Riedl KM, Kumar P, *et al.* Susceptibility of anthocyanins to ex vivo degradation in human saliva. *Food Chemistry*. 2012; 135: 738-747.

Kay CD. Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. *Nutrition Research Reviews*. 2006; 19: 137-146.

Liang L, Wu X, Zhao T, Zhao J, Li F, Zou Y *et al.* In vitro bioaccessibility and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) following simulated gastro-intestinal digestion. *Food Research International*. 2012; 46: 76-82.

Liobikas J, Skemiene K, Trumbeckaite S, Borutaite. Anthocyanins in cardioprotection: a path through mitochondria. *Pharmacological Research*. 2016.

Mallery SR, Budendorf DE, Larsen MP, Pei P, Tong M, Holpuch AS *et al.* Effects of human oral mucosal tissue, saliva and oral microflora on intraoral metabolism and bioactivation of black raspberry anthocyanins. *Cancer Prevention Research*. 2011; 4(8): 1209-1221.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005; 81 Supl S: 230-242.

Março PH, Poppi RJ, Scarminio IS, Tauler R. Investigation of the pH effect and UV radiation on kinetic degradation of anthocyanin mixtures extracted from *Hibiscus acetosella*. *Food Chemistry*. 2011; 125: 1020-1027.

Mateus N, Freitas V. Anthocyanins as food colorants. En: Gould K, Davies K, Winefield C, editores. Anthocyanins: biosynthesis, functions and applications. 1ra edición. New York: Springer; 2009. p.283-304.

McDougall GJ, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 2005; 5896:5904.

McDougall GJ, Fyffe S, Dobson P, Stewart D. Anthocyanins from red cabbage - stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*. 2007; 68: 1285-1294.

McGhie TK, Walton MC. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007; 51: 702-713.

Mehta AJ, Cassidy A, Litonjua AA, Sparrow D, Vokonas P, Schwartz J. Dietary anthocyanin intake and age-related decline in lung function: longitudinal findings from the VA Normative Aging Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2016; 103:542–50.

Mink PJ, Scrafford CG, Barraj LM, Harnack L, Hong CP, Nettleton JA *et al*. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007; 85:895–909.

Ovaskainen ML, Törrönen R, Koponen JM, Sinkko H, Hellström J, Reinivuo H, Mattila P. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *The Journal of Nutrition*. 2008; 138: 562–566.

Pantelidis GE, Vasilakakis M, Manganaris GA, Diamantidis Gr. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and cornelian cherries. *Food Chemistry*. 2007; 102: 777-783.

Passamonti S, Vrhovsek U, Vanzo A, Mattivi F. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *The Federation of European Biochemical Societies*. 2003; 544: 210-213.

Pérez-Magarriño S, Ortega-Heras M, Cano-Mozo E. Optimization of a solid-phase extraction method using copolymer sorbents for isolation of phenolic compounds in red wines and quantification by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008 56(24): 11560-11570.

Phippen WB, Simon JE. Anthocyanin in Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998; 46: 1734-1738.

Pierson JT, Dietzgen RG, Shaw PN, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR, Gidley MJ. Major Australian tropical fruits biodiversity: Bioactive compounds and their bioactivities. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2012; 52: 357-387.

Prior RL, Wu X. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*. 2006; 40(10): 1014–1028.

Prior RL. Anthocyanins: understanding their absorption and metabolism. En: Spencer JPE, Crozier A, editores. *Flavonoids and related compounds: bioavailability and function*. 1ra edición. USA: CRC Press; 2012. p.79-92.

Rayyan S, Fossen T, Nateland HS, Andesern ØM. Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug "Crataegi folium cum flore" (hawthorn). *Phytochemical Analysis*. 2005; 16: 334-341.

Riihinen KR, Gödecke T, Pauli GF. Purification of berry flavonol glycosides by long-bed gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2012; 1244: 20-27.

Rivera-López J, Ordorica-Falomir C, Wesche-Ebeling P. Changes in anthocyanin concentration in Lychee (*Litchi chinensis* Sonn) pericarp during maturation. *Food Chemistry*. 1999; 65: 195-200.

Sadilova E, Carle R, Stintzing FC. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007; 51: 1461 – 1471.

Scalzo RL, Genna A, Branca F, Chedin M, Chassaigne H. Anthocyanin composition of cauliflower (*Brassica oleracea* L.var. *Botrytis*) and cabbage (*B. oleracea* L. var. *Capitat*) and its stability in relation to thermal treatments. *Food Chemistry*. 2008; 107: 136-144.

Schmidt BM, Howell AB, McEniry B, Knight T, Seigler D, Erdman JW, *et al.* Effective separation of potent antiproliferation and antiadhesion components from wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52: 6433-6442.

Schwarz M, Hillebrand S, Habben S, Degenhardt A, Winterhalter P. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. *Biochemical Engineering Journal*. 2003; 14: 179-189.

Scordino M, Mauro AD, Passerini A, Maccarone E. Adsorption of flavonoids on resins: cyanidin 3-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52: 1965-1972.

Selma MV, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Interaction between Phenolics and Gut Microbiota: Role in Human Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57: 6485-6501.

Sengul H, Surek E, Nilufer-Erdil D. Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an in-vitro gastrointestinal digestion model. *Food Research International*. 2014; 62: 1069-1079.

Serafini M, Testa MF, Villaño D, Pecorari M, Wieren KV, Azzini E *et al.* Antioxidant activity of blueberries fruit is impaired by association with milk. *Free Radical Biology & Medicine*. 2009; 46: 769-774.

Shi PB, Yue TX, Ai LL, Cheng YF, Meng JF, Li MH *et al.* Phenolic compound profiles in grape skins of cabernet sauvignon, merlot, syrah and marselan cultivated in the shacheng area (China). *South African Journal for Enology and Viticulture*. 2016; 37(2): 132-138.

Solomon A, Golubowicz S, Yablowicz Z, Grossman S, Bergman M, Gottlieb HE, *et al.* Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54: 7717-7723.

Stalmach A, Edwards CA, Wightman JD, Crozier A. Gastrointestinal stability and bioavailability of (poly)phenolic compounds following ingestion of concord grape juice by humans. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2012; 00: 1-13.

Steyn WJ. Prevalence and Functions of Anthocyanins in Fruits. En: Kevin G, Kevin D, Chris W, editores del libro. *Anthocyanins. Biosynthesis, Functions, and Applications*. 1a ed. USA: Springer; 2009. p.85-105.

Stobiecki M, Kachlicki P. Isolation and identification of flavonoids. En: Grotewold E, editor. *The science of flavonoids*. 1ra edición. New York: Springer; 2006. p.47-69.

Stoner GD, Wang LS, Sardo C, Zikri N, Hecht SS, Mallery SR. Cancer prevention with berries: role of anthocyanins. En: Milner JA, Romagnolo DF, editores. *Bioactive compounds and cancer*. United States: Springer; 2010. p. 703-723.

Tachibana N, Kimura Y, Ohno T. Examination of molecular mechanism for the enhanced thermal stability of anthocyanins by metal cations and polysaccharides. *Food Chemistry*. 2014; 143: 452–458.

Talavéra S, Felgines C, Texier O, Besson C, Manach C, Lamaison JJ *et al.* Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *Journal of Nutrition*. 2004; 134: 2275-2279.

Tavares L, Figueira I, Macedo D, McDougall GJ, Leitão, Vieira HLA *et al.* Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus sp.*) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*. 2012; 131: 1443-1452.

Tsai PJ, McIntosh J, Pearce P, Camden B, Jordan BR. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus Sabdariffa L.*) extract. *Food Research International*. 2002; 35: 351-356.

Wallace TC. Anthocyanins in cardiovascular disease. *Advances in Nutrition*. 2011; 2: 1-7.

Walton MC, Hendriks WH, Broomfield AM, McGhie TK. Viscous food matrix influences absorption and excretion but not metabolism of blackcurrant anthocyanins in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 57(1): 22-29.

Wang E, Yin Y, Xu C, Liu J. Isolation of high-purity anthocyanin mixtures and monomers from blueberries using combined chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*. 2014; 1327: 39-48.

Wiese S, Gärtner S, Rawel HM, Winterhalter P, Kulling SE. Protein interactions with cyanidin-3-glucoside and its influence on α -amylase activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2009; 89: 33-40.

Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51: 609-614.

Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54: 4069-4075.

Wu X, Liang L, Zou Y, Zheo T, Li F *et al.* Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). *Food Chemistry*. 2011; 129: 443-453.

Yang M, Koo SI, Song WO, Chun OK. Food matrix affecting anthocyanin bioavailability: review. *Current Medicinal Chemistry*. 2011; 18: 291-300.

Yao L, Zhang N, Wang C, Wang C. Highly selective separation and purification of anthocyanins from bilberry based on a macroporous polymeric adsorbent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015; 63: 3543-3550.

Zafra-Stone S, Yasmin T, Bagchi M, Chatterjee A, Vinson JA, Bagchi D. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007; 51: 675 –683.

Zhang Y, Liao X, Chen F, Wu J, Hu X. Isolation, identification, and color characterization of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-sophoroside from red raspberry. *European Food Research and Technology*. 2008; 226: 395–403.

Zhang L, Fu Q, Zhang Y. Composition of anthocyanins in pomegranate flowers and their antioxidant activity. *Food Chemistry*. 2011; 127: 1444-1449.

Zheng W, Wang SY. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51: 502-509.