

**Perfil de antocianinas de tres variedades de  
frijol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas  
en Honduras**

**Felipe Elmi Ernesto Peguero Pérez**

**Zamorano, Honduras**

Diciembre, 2007

ZAMORANO  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Perfil de antocianinas de tres variedades de  
frijol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas  
en Honduras**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar  
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado  
Académico de Licenciatura.

Presentado por:

**Felipe Elmi Ernesto Peguero Pérez.**

**Zamorano, Honduras**  
Diciembre, 2007

El autor concede a Zamorano permiso  
para reproducir y distribuir copias de este  
trabajo para fines educativos. Para otras personas  
físicas o jurídicas se reservan los derechos del autor.

---

Felipe Elmi Ernesto Peguero Pérez

Zamorano, Honduras  
Diciembre, 2007

**Perfil de antocianinas de tres variedades de frijol rojo  
(*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en Honduras**

Presentado por:

Felipe Elmi Ernesto Peguero Pérez

Aprobado:

---

Francisco Bueso, Ph.D.  
Asesor Principal

---

Luis Fernando Osorio, Ph.D.  
Director  
Carrera Agroindustria Alimentaria

---

Juan Carlos Rosas, Ph.D.  
Asesor

---

Raúl Espinal, Ph.D.  
Decano Académico

---

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.  
Rector

## **DEDICATORIA**

A Dios, amo y señor del universo.

A mi madre Zoila María Pérez Gómez y familia.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiar mi vida y darme la oportunidad de concluir exitosamente una meta más en mi vida.

A mi madre Zoila María Pérez Gómez por estar siempre a mi lado y ser la fuerza de mi inspiración. A mi padre Juan Luciano Peguero por ser ejemplo de responsabilidad, perseverancia y compromiso social. A todos mis hermanos y especialmente a Dominga Peguero por el apoyo que me han brindado en el transcurso de mi vida estudiantil.

Al Dr. Raúl Espinal por el apoyo y la confianza y al Dr. Luis Fernando Osorio por su apertura como amigo, profesor y persona. A ambos por sus consejos de proyección de vida.

A mis asesores Dr. Francisco Bueso y el Dr. Juan Carlos Rosas por su ayuda y la confianza que depositaron en la elaboración de este proyecto.

Al Ing. Víctor Taleón y al Ing. Juan Xavier Elizalde por sus enseñanzas, su paciencia y colaboración en el desarrollo de este proyecto.

A todos los docentes de Zamorano por su paciencia en brindarme las herramientas necesarias para el desarrollo profesional.

A los empleados de Zamorano, especialmente a Vinny Núñez, Carla Henríquez y Karla Pérez por su amistad, consejos y escuchar mis problemas.

A mi compañero de cuarto, amigo y hermano Zamorano Rafael Herasme Peña, por su apoyo, sinceridad, confianza y amistad durante los cuatro años que pasamos juntos en Zamorano.

A mis amigos de Zamorano, a la clase “Centauro 07” y a la colonia dominicana por su amistad y compañía.

A mis amigos de siempre Lía y Lupu por el ánimo que me brindaron para seguir adelante con este estudio.

## **AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES**

A la AGEAP “Wilson Popenoe”, Fundación Papa y General Cigar por la ayuda financiera para completar el ciclo de cuatro años en Zamorano.

A Miguel Cordero por el apoyo económico y sus consejos de proyección de vida.

A Dominga Peguero por el apoyo económico brindado en el transcurso de mis estudios.

Al Programa de Investigación de Frijol de Zamorano (PIF) por el financiamiento parcial de este estudio.

## RESUMEN

Peguero, F. 2007. Perfil de antocianinas de tres variedades de frijol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en Honduras. Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. 51p.

Las antocianinas son los compuestos responsables del color rojo en el frijol. Conocer su composición y contenido provee información útil para entender su color, la estabilidad del color en almacén, usos viables como colorantes naturales, y propiedades nutraceuticas. El objetivo de este estudio fue identificar y cuantificar las antocianinas en tres variedades de frijol cultivadas en Honduras. Con esta finalidad se modificaron varias metodologías de extracción, purificación y concentración de antocianinas para obtener una que se adaptara a las condiciones existentes en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano. Se desarrollaron dos métodos cromatográficos con 14 modelos lineales: nueve para estimar concentraciones de antocianinas y cinco para antocianidinas con  $R^2 > 0.999$ . Con ambos modelos cromatográficos más las herramientas del HPLC Agilent® serie 1100 se determinó un compuesto adicional (petunidina) que mostró máxima absorbancia en el rango visible a 524 nm y 272 nm en el rango ultravioleta. Tres tipos de antocianinas (perlagonídicas, cianídicas y petunídicas) predominaron en la variedad Amadeus-77, mientras que para las variedades Seda y Dorado se identificaron cinco (pelargonídicas, cianídicas, petunídicas, malvinídicas y peonídicas). Con este estudio se establecieron las bases para determinar las razones químicas del por qué el color del frijol se oscurece en almacén, con la finalidad posterior de desarrollar mecanismos para mantenerlo.

**Palabras clave:** antocianidinas, cianidina, flavonoides, HPLC y pelargonidina.

## CONTENIDO

Portadilla .....	i
Autoría .....	ii
Página de firmas .....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos .....	v
Agradecimientos a patrocinadores .....	vi
Resumen .....	vii
Contenido .....	viii
Índice de cuadros .....	x
Índice de figuras .....	xi
Índice de anexos .....	xii
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 OBJETIVOS .....	2
1.1.1 Objetivo general .....	2
1.1.2 Objetivos específicos .....	2
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 CONCEPTOS BÁSICO DE ANTOCIANINAS .....	3
2.2 ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS .....	5
2.3 POLARIDAD DE LAS ANTOCIANINAS .....	5
2.4 EFECTO DEL PH EN LAS ANTOCIANINAS .....	6
2.5 ANTOCIANINAS EN FRIJOLES .....	8
2.6 EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS .....	10
2.7 EXTRACCIÓN DE AGLICONAS .....	11
2.8 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN .....	11
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
3.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO .....	13
3.2 MATERIALES Y EQUIPO .....	13
3.2.1 Material vegetativo .....	13
3.2.2 Materiales de laboratorio .....	13
3.2.3 Equipo .....	14
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL .....	14
3.4 METODOLOGÍA .....	15
3.4.1 Método de análisis del pH en la testa de frijol .....	15
3.4.2 Método de análisis de color .....	15

3.4.3 Método para determinar las condiciones cromatográficas.....	15
3.4.4 Método para desarrollar los modelos lineales de los estándares antocianídicos.	16
3.4.5 Método de validación de las curvas de calibración.....	16
3.4.6 Método de extracción y purificación de antocianinas.....	16
3.4.7 Método de hidrólisis ácida.....	18
3.4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	19
4. <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	20
4.1 ANÁLISIS DE PH.....	20
4.2 ANÁLISIS DE COLOR.....	21
4.3 CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	21
4.4 ANÁLISIS DE ANTOCIANINAS.....	23
4.4.1 Análisis de perfil de antocianinas .....	23
4.4.2 Contenido de antocianinas totales.....	29
4.4.3 Comparación estadística del contenido total de antocianinas entre las variedades Dorado, Amadeus-77 y Seda.....	30
5. <b>CONCLUSIONES</b> .....	31
6. <b>RECOMENDACIONES</b> .....	32
7. <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	33
8. <b>ANEXOS</b> .....	37

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Antocianidinas más comunes y grupos R sustituyentes, organizadas según su orden de polaridad.....	4
2. Antocianinas totales reportadas en frijol rojo y negro .....	9
3. Contenido de antocianinas en frutas frescas comúnmente usadas como fuentes de colorante naturales.....	9
4. Cuantificación de antocianinas en <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “Tolosa”.....	10
5. PH de la testa del grano de las variedades Seda, Amadeus-77 y Dorado.....	20
6. Separación de medias para los atributos de color. ....	21
7. Modelos lineales para predecir antocianinas. ....	22
8. Modelos lineales para predecir agliconas. ....	23
9. Perfil de antocianinas y antocianidinas en las variedades estudiadas.....	26
10. Tabla comparativa de perfiles antocianídicos de las variedades estudiadas con otros estudios en frijol rojo.....	26
11. Cantidad porcentual de agliconas antes de la hidrólisis ácida. ....	28
12. Cantidad porcentual de agliconas luego de la hidrólisis ácida. ....	28
13. Perfiles antocianídicos encontrados en las variedades estudiadas.....	29
14. Contenido de antocianina en la testa y en el grano.....	29
15. Comparación estadística del contenido total de antocianinas.....	30

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura	Página
1. Estructura química de las antocianidinas.....	3
2. Estructura del catión flavilio.....	3
3. Estructura química de las antocianinas.....	4
4. Ecuación del efecto del pH en la forma de las antocianinas.....	7
5. Distribución de las estructuras de antocianinas en función del pH.....	7
6. Espectro de absorbancia en el rango UV-VIS del pico no identificado.....	23
7. Cromatograma de antocianinas en la variedad Seda.....	24
8. Cromatograma de antocianinas en la variedad Amadeus-77.....	24
9. Cromatograma de antocianinas en la variedad Dorado.....	25
10. Cromatograma de agliconas para identificar petunidina en la variedad Seda.....	25

**INDICE DE ANEXOS**

Anexo	Página
1. Condiciones cromatográficas para separar antocianinas. ....	38
2. Condiciones cromatográficas para separar antocianidinas. ....	39
3. Cromatogramas de estándares puros de antocianinas. ....	40
4. Cromatograma de estándares puros de antocianidinas. ....	41
5. Observaciones al determinar las condiciones cromatográficas para antocianinas y para agliconas. ....	42
6. Comparación en resolución por efecto de acidez. ....	43
7. Datos medios de tres repeticiones para desarrollar modelos lineales en el método cromatográfico de antocianinas. ....	44
8. Datos medios de tres repeticiones para desarrollar modelo lineales en el método cromatográfico de antocianidinas. ....	46
9. Datos de concentraciones conocidas de antocianinas para validar los modelos lineales de predicción de antocianinas. ....	48
10. Datos con concentraciones conocidas de agliconas para validar los modelos lineales de predicción de agliconas. ....	50
11. Cálculos para pasar de ppm a (mg de antocianinas/100 g de testa). ....	51

## 1. INTRODUCCIÓN

El color del frijol es una de las principales características que el consumidor centroamericano toma en cuenta al momento de la compra. Esto lo convierte en un factor importante al establecerse los precios de venta del frijol. Así en Honduras, El Salvador y Nicaragua el consumidor prefiere un grano de un tono color rojo claro llamado típicamente “frijol color seda”, mientras que en Guatemala y Costa Rica prefieren un frijol de color negro (Martínez *et al.*, 2004).

Los consumidores hondureños tienen una fuerte preferencia por el color rojo claro del grano, razón por la cual, las variedades rojas oscuras llamada típicamente “frijol retinto” están menos cotizadas en el mercado que las variedades de frijol color seda. Martel (1995) encontró, en promedio, que los agricultores reciben 16% menos ingresos por la variedad Dorado (debido a su color rojo oscuro) comparado con variedades tradicionales color seda.

El Programa de Investigación de Frijol (PIF) en Zamorano ha enfocado su investigación al desarrollo de variedades resistentes a enfermedades, plagas y condiciones adversas como sequía y baja fertilidad; asimismo toma en cuenta la arquitectura de la planta y el color del grano (valor comercial). Como resultado de estas investigaciones está la liberación al mercado de las variedades Dorado, Don Silvio, Tío Canela, Amadeus-77 y Cardenal Oro, respectivamente.

Aunque las últimas variedades liberadas al mercado son más claras, los consumidores aún prefieren las variedades tradicionales color seda (paraisito, por ejemplo) por la claridad del color rojo.

El color del frijol se puede ver afectado por las condiciones climáticas en la época de cosecha; así como por el proceso y el tiempo de acondicionamiento. A mayor tiempo o temperatura de acondicionamiento el color del grano se oscurece en forma proporcional.

En un esfuerzo por entender el mecanismo de oscurecimiento del grano del frijol, el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano ha desarrollado estudios para evaluar el comportamiento en color de las variedades roja claras y oscuras en almacén (Taleón, 2005). En dicho estudio quedó demostrado que las variedades color seda tienen mayor variación del color en almacén que las variedades de color retinto. Sin embargo, aún no hay un estudio que explique por qué el color de las variedades color seda es menos estable que el color de las variedades retintas.

Por las razones antes descritas, el objetivo de este estudio fue determinar la composición de los compuestos responsables por el color (antocianinas) en variedades de frijol rojo distribuidas en el rango de rojo claro a rojo oscuro y cultivadas en Honduras.

En estudios posteriores se pretende buscar mecanismos para retardar el oscurecimiento y entender las razones por la cual cambia el color asociando cambios del color *vs* cambios en la cantidad y composición de los compuestos asociados al color.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo general**

- Determinar el perfil de antocianinas en tres variedades de frijol rojo cultivadas en Honduras.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

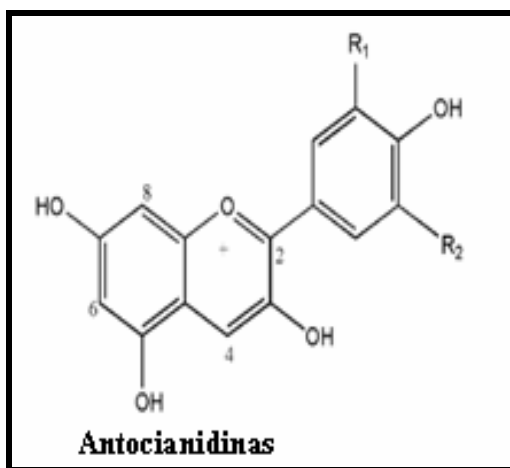
- Definir las condiciones cromatográficas ideales para identificar y cuantificar antocianinas y antocianidinas.
- Realizar modelos lineales para predecir antocianinas y antocianidinas a partir de sus estándares puros.
- Determinar y comparar el perfil y la cantidad de antocianinas de las variedades Seda, Amadeus-77 y Dorado.
- Desarrollar la metodología para medir pH en la testa de las variedades Seda, Amadeus-77 y Dorado.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

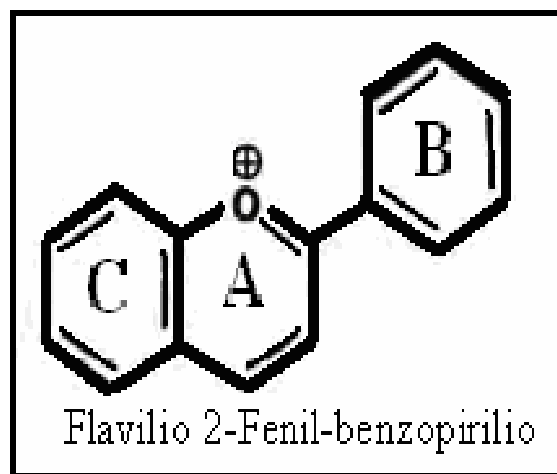
### 2.1 CONCEPTOS BÁSICO DE ANTOCIANINAS

Las antocianinas constituyen uno de los mayores grupos de pigmentos naturales solubles en agua y son responsables de los colores rojos, amarillo, púrpuras y azul en frutas y vegetales al igual que en flores (Rivas-Gonzalo, 2003; Strack *et al.*, 1993). En reciente años, numerosos estudios han sido llevados a cabo, cuyo principal objetivo ha sido la caracterización de antocianinas en diferentes productos naturales, entre estos frijoles (*Phaseolus vulgaris* L.), con el objetivo de usar estos compuestos fenólicos como alternativos a colorantes sintéticos usados en la industria alimentaria (Harbone *et al.*, 1988; Hong y Wrolstad, 1990.)

Las antocianinas químicamente son glucósidos de las antocianidinas, y éstas son, por tanto, las agliconas de las antocianinas. La estructura básica de las antocianidinas o agliconas es el grupo flavilio (2-fenil-benzopirilio) (Wong, 1995). En la Figura 1, 2 y 3 se muestran el grupo flavilio y la estructura básica de las antocianidinas.



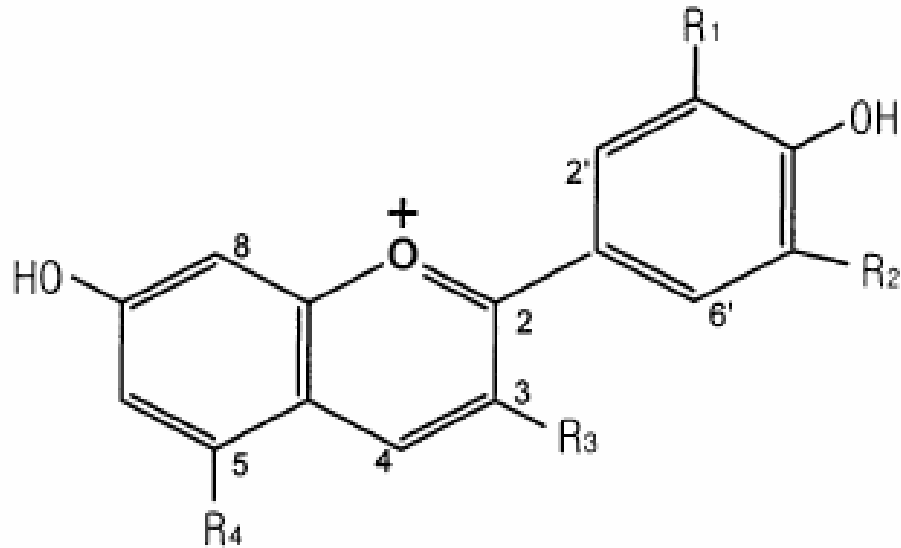
Fuente: Wong (1995).



Fuente: Wong (1995).

Figura 1. Estructura química de las antocianidinas.

Figura 2. Estructura del catión flavilio.



Antocianina	R1	R2	R3	R4
Cianidina 3,5-diglucósido	OH	H	O-B-D-glucosa	O-B-D-glucosa
Delfinidina 3-glucósido	OH	OH	O-B-D-glucosa	OH
Cianidina 3-glucósido	OH	H	O-B-D-glucosa	OH
Petunidina 3-glucósido	OCH <sub>3</sub>	OH	O-B-D-glucosa	OH
Pelargonidina 3-glucósido	H	H	O-B-D-glucosa	OH

Fuente: Choung *et al.* (2004).

Figura 3. Estructura química de las antocianinas.

Se han identificado en forma natural más de 540 pigmentos antocianídicos (Anderson y Francis, 2004). Aunque en la naturaleza hay 17 antocianidinas, seis de ellas son las más dispersas y las que comúnmente contribuyen a la coloración de las mayorías de plantas; estas son cianidina (Cy), delfinidina (Df), malvidina (Mv), pelargonidina (Pg), peonidina (Pn) y petunidina (Pt) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Antocianidinas más comunes y grupos R sustituyentes, organizadas según su orden de polaridad.

Antocianidina	R1	R2	$\lambda_{\text{máx}}^1$ (nm) CH <sub>3</sub> OH/HCL 0.01%	Presencia
Delfinidina (Df)	OH	OH	546	Delfinium
Cianidina (Cy)	OH	H	535	Manzana
Petunidina (Pt)	OCH <sub>3</sub>	OH	543	Petunia
Pelargonidina (Pg)	H	H	520	Fresa
Peonina (Pn)	OCH <sub>3</sub>	H	532	Peonia
Malvidina (Mv)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	542	Uvas

Fuente: (Wong, 1995).

<sup>1</sup> $\lambda_{\text{máx}}$ : máxima absorbancia en el espectro.

Debido a la inestabilidad electrofílica del catión flavilio, es común encontrar dichos compuestos glucosilados con en la posición 3 y 5 como se muestra en la Figura 3, los cuales pueden o no estar acilados (unión glucosa-ácido orgánico). Los compuestos con los cuales se acila el azúcar normalmente son ácidos orgánicos como p-cumárico, caféico, ferúlico, málico y acético. A pesar de que las antocianinas están glucosiladas aún presentan inestabilidad a temperatura, cambios de pH, oxidación, entre otros. Por tal razón, se condensan en la posición 4 dando como resultados pro-antocianidinas o taninos condensados a las cuales se le atribuye alto poder antioxidante (Wong, 1995). Más del 50% de las antocianinas en vinos se pierde en forma de taninos condensados.

## 2.2 ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS

Las antocianinas presentan serios inconvenientes relacionados a su estabilidad, ya que en solución ellas son afectadas por la luz, cambios en pH, temperatura, oxidación, presencia de otros flavonoles y metales (Brouillard, 1982; Harborne y Grayer, 1988).

Debido a la deficiencia electrónica del núcleo flavilio las antocianidinas tienden a reacciones que alteran su estructura (Harborne y Williams, 2001). Su estabilidad incrementa a mayor número de grupos metóxilos en el anillo B y decrece a mayor cantidad de grupos hidroxilos en la molécula. Según Kong (2003) y Zhang (2001), el orden de estabilidad de las antocianidinas es Df < Pg < Cy < Pt < Pn < Mv.

Cuando la molécula es glucosilada o acilada su estabilidad incrementa, así, los diglucósidos son más estables que su correspondiente monoglucósido (Harborne, 2001; Tomás-Barberán, 2000).

Dao *et al.*, (1998), observó que las agliconas delfinidina, petunidina y malvidina, en una solución de metanol acidificado desaparecieron completamente luego de 48 h a temperatura ambiente y luego de cuatro días en refrigeración (4°C). Ese mismo autor observó, sin embargo, que cuando las antocianidinas permanecen retenidas en un cartucho C<sub>18</sub> su estabilidad incrementó considerablemente manteniéndose constante luego de 7 días a temperatura ambiente.

## 2.3 POLARIDAD DE LAS ANTOCIANINAS

Desde un punto de vista técnico, una de las principales ventajas de las antocianinas es su hidro-solubilidad, la cual facilita su incorporación en diferentes productos alimenticios.

La polaridad de las antocianidinas está determinada por el grupo sustituyente en el anillo B, a mayor número de grupos metóxilos sustituyentes menor es la polaridad, incrementándose a mayor número de grupos hidróxilos (Cuadro 1 y Figura 1 y 2).

A mayor cantidad de azúcares sustitutos mayor es la polaridad del compuesto, sin embargo, cuando los azúcares son del tipo acilado, el tiempo de retención cromatográfico aumenta.

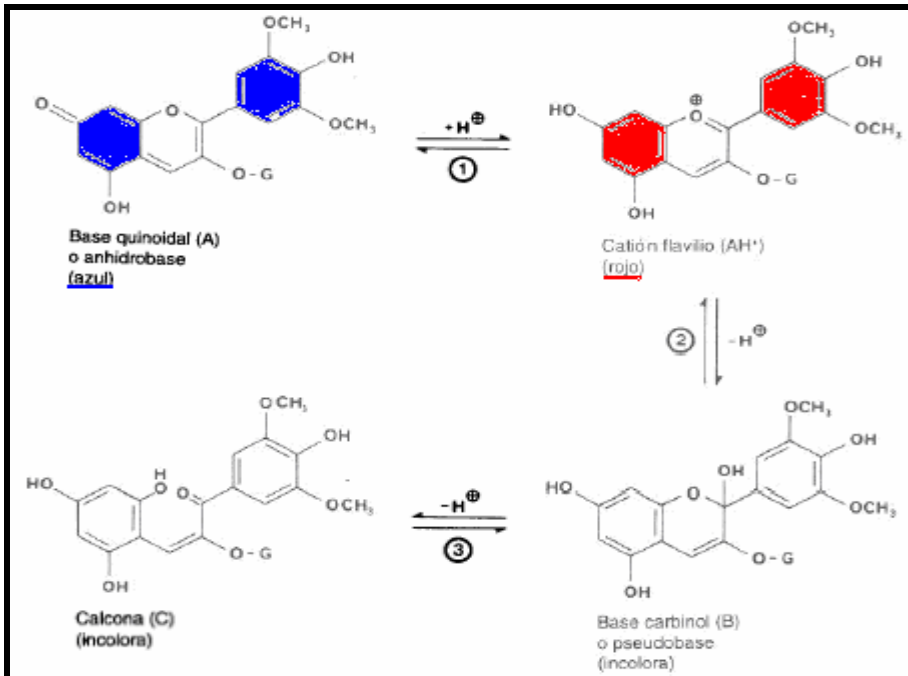
El tiempo de elusión cromatográfico está determinado por la polaridad de la molécula. El orden se mantiene cuando los grupos hidróxilos en la posición 3 y 5 son sustituidos por azúcares (Figura 3). No obstante, a mayor cantidad de azúcares sustitutos mayor es la polaridad del compuesto, por lo cual siempre los diglucósidos eluyen primero que los monoglucósidos y por último las agliconas (Kong, 2003; Zhang, 2001).

## 2.4 EFECTO DEL PH EN LAS ANTOCIANINAS

Las antocianinas son compuestos cromóforos al igual que los carotenos y las xantofilas. Tales compuestos al tener estructuras resonantes tienen conjugación electrónica, lo cual aumenta a medida la molécula tiene grupos sustituyentes con pares de electrones no compartidos. A partir de esto se generan alteraciones en la configuración electrónica que provocan cambios en la forma de la molécula y por ende un desplazamiento de la máxima absorbancia en el espectro ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) (Wong, 1995).

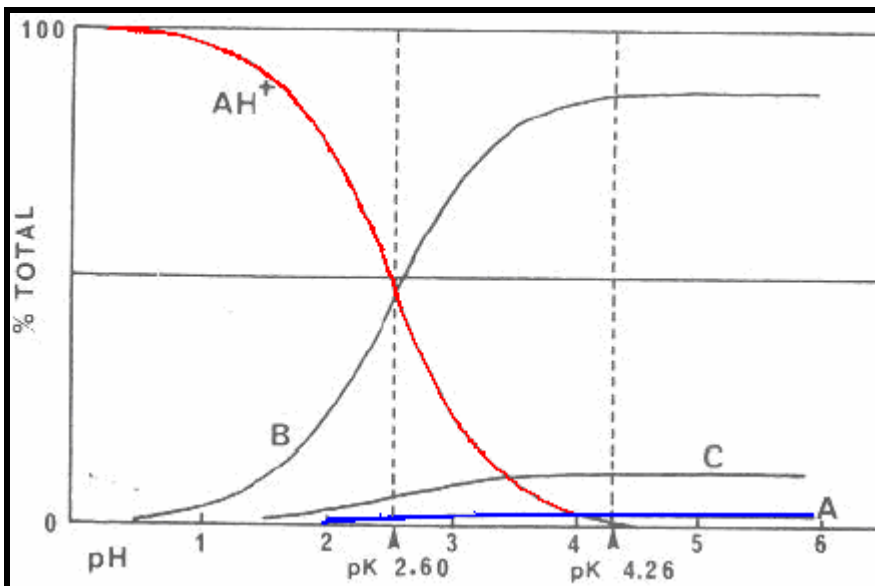
Cuando el medio es altamente ácido, la cantidad de protones ( $\text{H}^+$ ) libres bloquean los pares de electrones no compartidos de los grupos sustituyentes, con lo cual se evita que el fenómeno de conjugación electrónica incremente y cause inestabilidad de la molécula.

Por el fenómeno de conjugación electrónica o comportamiento batocrómico, las antocianinas tienden a cambiar su estructura a diferentes pH (Figura 4 y 5). Debajo de pH 1 el catión flavilio se encuentra principalmente en la forma  $\text{AH}^+$ , el cual es rojo intenso. A medida el pH sube, la forma  $\text{AH}^+$  del catión flavilio disminuye por el efecto de conjugación del catión flavilio o hidratación del C2. Así se incrementa la forma carbinol (B) que es incolora. También, a medida disminuye la forma del catión flavilio se forma adicionalmente la base quinoidal (A), de color azul, por la pérdida de un protón en el C7. La forma hidratada del catión flavilio (base carbinol) por conjugación pasa a ser una calcona (C) la cual es fácilmente degradada a ácidos. Por esta razón, las antocianinas se degradan más rápido a pH altos que bajos. La misma razón justifica por qué los picos cromatográficos tienen menos resolución a más alto el pH, lo cual se explica por la formación de derivados del catión flavilio (base quinoidal, calconas y base carbinol) interfiriendo en la absorbancia a 520 nm (longitud de onda más usada para identificar antocianinas).



Fuente: Wong (1995).

Figura 4. Ecuación del efecto del pH en la forma de las antocianinas



Fuente: Wong (1995)

Figura 5. Distribución de las estructuras de antocianinas en función del pH. Malvidina 3-glucósido; 25°C. AH<sup>+</sup> = catión flavilio rojo, B = base carbinol incolora, C = calcona incolora, A = base quinoidal azul.

## 2.5 ANTOCIANINAS EN FRIJOLES

A pesar de la importancia mundial del frijol como fuente de carbohidratos y proteína, la investigación sobre la composición de antocianina en dichas legumbres es escasa. El contenido de antocianinas en la testa de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) fue divulgado por primera vez por Feenstra en 1960 quien encontró cuatro antocianinas, Mv 3-gluc, Pt 3-gluc y Df 3-gluc en frijoles negro violeta (*Phaseolus vulgaris* L.). Desde entonces varios investigadores han identificado diversos tipos de antocianinas.

Okita *et al.*, (1972), encontró Mv 3,5-digluc como la principal antocianina seguido por Df 3-gluc, Pt 3-gluc, Mv 3-gluc en la variedad de frijol negro Kurodanekinugasa. En otro estudio, Stanton y Francis (1966), reportaron Df 3-gluc como la principal antocianina en el cultivar Canadian Wonder (negro) seguido por pequeñas cantidades de Cy 3-gluc, Cy 3,5-digluc, Pg 3-gluc y Pg 3,5-digluc.

Choung *et al.*, (2003), observó la predominancia de Pg 3-gluc en frijol rojo seguido por Cy 3,5-digluc, Df 3-gluc y Cy 3-gluc. En frijol negro cuyo contenido antocianídico fue mayor, sólo encontró dos antocianinas, Df 3-gluc como la principal seguido por Pt 3-gluc. Por otro lado, Moreno (2004), reportó Df 3-gluc como la principal antocianina en frijol negro seguido por Pt 3-gluc y Mv 3-gluc.

Debido a la inestabilidad que tienen las antocianidinas raramente aparece en la naturaleza (Dao *et al.*, 1998), y hasta el momento sólo un autor ha publicado antocianidinas en forma natural en frijoles (Macz-Pop, 2004).

Gran parte de los estudios coinciden que la principal antocianina es siempre Df 3-gluc (Choung *et al.*, 2004; Takeoka *et al.*, 1997) aunque hay importantes diferencias relacionada a la variedad, como por ejemplo en *Phaseolus lunatus* L., donde la principal antocianina es Pn 3-gluc, seguido por Pn 3-rutinósido.

El contenido total de antocianinas en frijoles (Cuadro 2) es dependiente del genotipo, el manejo de cultivo y de las condiciones ambientales presentes durante el ciclo de vida del cultivo, sin embargo, en una variedad el perfil tiende a mantenerse constante (Choung *et al.*, 2003; Moreno, 2004).

Cuadro 2. Antocianinas totales reportadas en frijol rojo y negro

Referencia	Color del frijol	Grano mg/100 g <sup>1</sup>	Testa mg/100 g <sup>2</sup>
Moreno, 2004	Negro	37.7 a 71.9	1010 a 1810
Takeoka <i>et al.</i> , 1997	Negro	213	NR*
Yoshida <i>et al.</i> , 1996	Negro	NR*	10 a 360
Choung <i>et al.</i> , 2004	Negro	NR*	214 a 278
Choung <i>et al.</i> , 2004	Rojo	NR*	70
Macz-Pop, 2004	Rojo	24.1	207

\* No reportada

<sup>2</sup>100 g de grano molido<sup>1</sup>100 g de testa molida

Otras razones por las que el contenido total de antocianinas es diferente entre autores radica en la metodología de extracción y purificación y que el método de determinación sea cromatográfico o espectrofotométrico (Macz-Pop, 2004).

Un proceso para obtener antocianidinas a partir de extractos de pigmentos antocianídicos es sometiendo la muestra a hidrólisis ácida y sometida a análisis inmediato para evitar degradación. Mediante este método, Espinosa *et al.* (2006), determinó que la principal antocianidina en 62 variedades mexicanas fue Df seguido por Pt, Cy, Mv, Pg y Pn.

Los frijoles representan una fuente importante de antocianinas, ya que se han determinado cantidades en el rango en el cual se encuentran las frutas que comúnmente se usan como fuentes de colorantes naturales (Cuadro 4).

Cuadro 3. Contenido de antocianinas en frutas frescas comúnmente usadas como fuentes de colorante naturales.

Producto	Contenido <sup>1</sup> (mg/100g)
Arándano azul ( <i>Vaccinium corymbosum</i> )	20 – 500
Arándano rojo ( <i>Vaccinium oxycoccus</i> )	60 – 200
Uva pasa negra ( <i>Ribes nigrum</i> )	30 – 40
Uva roja ( <i>Vitis vinifera</i> )	30 – 750
Frambuesa negra ( <i>Rubus occidentalis</i> )	170 – 430
Frambuesa roja ( <i>Rubus idaeus</i> )	10 – 60
Fresa ( <i>Fragaria vesca</i> )	20 – 90
Elderberry ( <i>Sambucus melanocarpa</i> )	200 – 1000
Lechuga roja ( <i>Brassica oleracea var. capitata f. rubra</i> )	30 – 90

Fuente: Awika *et al.*, (2004).<sup>1</sup> Peso fresco en mg de antocianinas por 100g de muestra.

## 2.6 EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS

Las antocianinas son solubles en solventes polares y son extraídos normalmente de los materiales vegetales usando metanol acidificado con ácido clorhídrico o ácido fórmico. El ácido al bajar el pH de la solución previene la degradación de los pigmentos antocianídicos no acilados (Choung *et al.*, 2004; Wong, 1995; Awika *et al.*, 2004).

Revilla *et al.* (1998), encontró en uvas rojas que usando 0.12 mol/L del ácido clorhídrico se puede causar la hidrólisis parcial de las antocianinas no aciladas y aciladas. Sin embargo, varios estudios contradicen a Revilla (Dao *et al.*, 1998; Merken *et al.*, 2001), ya que para generar hidrólisis requirieron concentraciones mayores a 1.2 M.

Merken *et al.*, (2001), utilizando extracto puro de antocianinas, ensayó diferentes concentraciones de HCl (0.6-2.4 M) en 50% metanol para generar hidrólisis, con dicho experimento concluyó que para generar una hidrólisis efectiva se requiere utilizar concentraciones encima de 1.8 M.

Choung *et al.* (2004) y Awika *et al.* (2004), utilizaron metanol acidificado al 1% (0.12 molar) sin causar hidrólisis de las antocianinas. Macz-Pop (2004), encontró que el mejor agente acidificante para extraer antocianinas a partir de la testa de frijol fue HCl como se muestra en el Cuadro 4. El objetivo de usar dicho ácido, aparte de proveerle estabilidad a la molécula es provocar la lisis de la matriz donde están las antocianinas y conseguir una mayor liberación de los compuestos de interés.

Cuadro 4. Cuantificación de antocianinas en *Phaseolus vulgaris* L. “Tolosa”.

Pico	Compuesto	HCl* 0.5%	HCL 0.2%	HCL 0.1%	TFA* 3%	TFA 2%
1	Cy 3,5-digluc	1.98 (8.2)	0.85 (7.2)	0.41 (10.0)	0.76 (9.5)	0.49 (9.9)
2	Pg 3,5-digluc	1.54 (6.4)	0.82 (7.0)	0.43 (10.5)	0.75 (9.4)	0.56 (11.3)
3	Cy 3-gluc	3.99 (16.5)	1.7 (14.4)	0.84 (20.5)	1.61 (20.2)	0.96 (19.3)
4	Pg 3-gluc	12.6 (52.3)	5.37 (45.6)	2.41 (58.9)	4.78 (61.0)	2.96 (59.6)
5	Cy <sup>a</sup>	1.63 (6.8)	1.36 (11.5)			
6	Pn <sup>a</sup>	1.36 (5.7)	1.09 (9.3)			
7	Pg <sup>a</sup>	0.95 (4.0)	0.59 (5.0)			
Total		24.1	11.8	4.09	7.99	4.97

Fuente: Macz-Pop, (2004).

<sup>a</sup> Antocianidinas identificadas en forma natural sin usar hidrólisis ácida.

Resultados expresados en mg/100g de grano entero y en (porcentaje del total de antocianinas).

\*TFA: ácido trifluoroacético; HCl: ácido clorhídrico.

Aparte del metanol acidificado algunos autores utilizan acetona para la extracción de antocianinas (Giusti *et al.*, 1998; Garcia-Viguera *et al.*, 1998). La ventaja de éste respecto al metanol es que permite usar una temperatura mucho más baja para la concentración de la muestra. Sin embargo, la mayoría de estudios en antocianinas coinciden con la utilización de metanol acidificado para la extracción; Awika *et al.*, (2004), comprobó que usando metanol acidificado se obtiene mayor cantidad de antocianinas que con acetona acidificada.

Una vez que el proceso de extracción ha concluido, es necesario someter la muestra a un proceso de purificación, con el objetivo de eliminar sustancias como lípidos, carotenos o clorofila que podrían interferir en los posteriores análisis cualitativos y cuantitativos (Buldini *et al.*, 2002; Chandra *et al.*, 2001; Pascual-Teresa, 2000). Según Macz-Pop (2004), cuando se usa hexano para eliminar componentes hidrofóbicos la resolución de los cromatogramas aumenta.

Una técnica común usada para purificar es la extracción de fase sólida (SPE) con C<sub>18</sub> o Sephadex. Los grupos hidróxilos libres de las antocianinas son retenidos fuertemente por la matriz del cartucho requiriendo de gradientes polares para eluir los compuestos fenólicos. De esta manera, Talcott (2002), propone que SPE es una técnica apropiada para eliminar compuestos hidrófilos que puedan interferir con análisis posteriores, entre estos, azúcares y ciertos ácidos orgánicos. Esta técnica, a la vez, es reconocida como un paso de concentración, sin embargo Macz-Pop (2004), detectó pérdida en este proceso, las cuales se redujeron con el uso de cartuchos C<sub>18</sub> de menor porosidad y mayor capacidad de carga (500 mg, por ejemplo).

## **2.7 EXTRACCIÓN DE AGLICONAS**

Todas las publicaciones enfocadas a determinar el contenido de agliconas, luego de la purificación de la muestra, someten la muestra a hidrólisis ácida con altas temperaturas para causar la formación de agliconas en vista que usando la extracción normal siempre las antocianinas aparecen en forma glucosilada (Merken *et al.*, 2001).

Espinosa *et al.* en el 2006 utilizó hidrólisis ácida para cuantificar antocianinas totales en frijoles mexicanos. De esta manera expresaron antocianinas totales en función de agliconas.

## **2.8 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN**

El mayor contenido de publicaciones relacionadas a la cuantificación de antocianinas y polifenoles está en vinos. Al igual que en frijol el color del vino cambia en almacén, pero también puede verse afectado por las condiciones ambientales y las prácticas de manufactura (Boulton *et al.*, 1998; Riberau *et al.*, 1985; Somers, 1998).

Entre los métodos propuestos para medir componentes asociados al color se incluyen métodos espectrofotométricos (Boulton *et al.*, 1999) y métodos cromatográficos (Baldi *et al.*, 1992).

Cada método presenta ventajas y limitaciones. Normalmente los métodos espectrofotométricos sobreestiman el contenido de antocianinas comparado con los obtenidos mediante cromatografía debido a la interferencia de pigmentos antocianídicos polimerizados (Bakker *et al.*, 1986; Rivas-Gonzalo *et al.*, 1992).

La mayor cantidad de estudios llevados a cabo para cuantificar antocianinas individuales y fenoles específicos en frijoles han sido realizados con cromatografía líquida (Choung *et al.*, 2004; Macz-Pop, 2004); no obstante, para determinar antocianinas totales y fenoles totales los métodos más usados en vinos, frutas y frijoles son espectrofotométricos (Moreno, 2004).

Dadas las limitaciones de estándares comercialmente disponibles, algunos autores recurren a aislar antocianinas mediante fraccionamiento con una columna C<sub>18</sub> semi-preparativa (Choung *et al.*, 2003), las cuales tienen mayor capacidad de carga que las columna C18 normales (un ml de extracto antocianídico, por ejemplo).

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ) de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano ubicada a 32 km al sureste de Tegucigalpa, Honduras.

### **3.2 MATERIALES Y EQUIPO**

#### **3.2.1 Material vegetativo**

Tres variedades en el rango rojo claro, rojo intermedio y rojo oscuro (Seda, Amadeus-77 y Dorado, respectivamente), las cuales fueron cultivadas en tres regiones (Zamorano, Jamastrán y Lago de Yojoa) de Honduras. Las variedades luego de cosechadas, seleccionadas y preparadas comercialmente fueron enviadas al LAAZ para posterior análisis.

#### **3.2.2 Materiales de laboratorio**

- Papel de aluminio, parafina y viales de cuatro ml color topacio.
- Papel aluminio, parafina y Viales de cuatro ml color topacio.
- Cristalería del Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano.
- Jeringa 50  $\mu$ L, graduada 0.1  $\mu$ L, marca Halmilton.
- Cartuchos ODS-C18 SPE, 6 ml, 500 mg, Supelco proveído por Agilent Technologies.
- Filtros de membrana de Nylon de 0.45  $\mu$ m y 0.2  $\mu$ m, marca Supelco.
- Estándares comerciales de antocianinas ChromaDex™ Inc., comprado a Sigma Agilent (St. Louis, MO):
  - Antocianinas diglucósido (Cy 3,5-digluc y Pg 3,5-digluc).
  - Antocianinas monoglucósidos (Cy 3-gluc, Pg 3-gluc, Pn 3-gluc y Mv 3-gluc).
  - Antocianidinas (Df, Cy, Pg, Pn y Mv).
- Solventes:
  - Acetonitrilo acidificado con 0.035% de ácido fórmico grado HPLC proveído por Sigma Agilent (St. Louis, MO).

- Metanol grado reactivo proveído por Sigma Agilent (St. Louis, MO).acidificado con 1% HCL.
- Agua destilada, filtrada a 0.45  $\mu$ L y acidificada con 0.1% de ácido trifluoracético (TFA).

### 3.2.3 Equipo

- Polistrón marca (Biospek, modelo OK 74005).
- Baño ultrasónico marca (Fisher Scientific).
- Colorflex HunterLab Reston, VA (modelo número 45/0).
- Centrifugadora marca (IEC Model K).
- Vortex Genic 2™.
- Balanza ADVENTURER™, marca (OHAUS, modelo AR2140).
- Potenciómetro marca (ORION RESEARCH, modelo 701<sup>a</sup>).
- Campana marca (LABCONCO, Patente 6461233).
- Rotavapor marca (HAAKEBUCHLER, modelo N° 91295).
- Estufa marca (FISHER SCIENTIFIC, Catálogo 11-498-7SH).
- Estación procesadora de vacío marca (Agilent Technologies).
- Columna ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (150 mm x 4.6 mm x 5 $\mu$ m) con precolumna C<sub>18</sub> proveído por Sigma Aldrich.
- Intercambiador de calor del consistómetro de Brookfield (modelo RVDVII+).
- High Performance Liquid Chromatography marca (AGILENT serie 1100).
  - Desgasificador G1379A JP40724067
  - Bomba cuaternaria G1311A DE43633284
  - Detector de arreglo de diodo G1315B DE43626255
  - Inyector Manual G1328B DE11405091

### 3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con tres tratamientos y tres bloques. Los bloques correspondieron a las localidades de Zamorano, Jamastrán y Lago de Yojoa; mientras que los tratamientos correspondieron a las variedades de Seda, Amadeus-77 y Dorado.

En dicho modelo estadístico las variables evaluadas fueron: pH, color (L\*a\*b\*-Tono-Croma) y el contenido total de antocianinas.

### 3.4 METODOLOGÍA

#### 3.4.1 Método de análisis del pH en la testa de frijol

- Se extrajo de forma manual con un bisturí 0.5 g de testa.
- Se agregó 20 ml de agua destilada, previamente ajustada a pH= 7 con NaOH 0.01 M.
- Posteriormente, la muestra fue molida con un polistrón por cinco min asegurando que la temperatura no subiera más de 25°C.
- La muestra se dejó reposar por 10 min para lograr la suficiente interacción entre el agua y la matriz de la testa molida.
- Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 8,418g ( $g$ = gravedad) por cinco min con el objetivo de evitar interacción del electrodo con las partículas suspendidas en el medio. La alícuota se decantó y se midió el pH.

#### 3.4.2 Método de análisis de color

- Con el equipo HunterLab se obtuvieron los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ .  $L^*$  mide la luminosidad del color, con un rango desde 0 = negro hasta 100 = blanco;  $a^*$  puede tener valores positivos (rojo) o negativos (verde) y  $b^*$  puede tener valores positivos (amarillo) o negativos (azul).
- Los valores  $a^*$  y  $b^*$  se convirtieron a tono y croma según la ecuación propuesta por (McGuire, 1992): Tono =  $\tan^{-1}(b^*/a^*)$ , y Croma =  $(a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$ .

Moreno (2004), para medir color en frijol utilizó la nomenclatura  $L^*$ , Tono y Croma.

Gran parte de los estudios en antocianinas en frutas, para evaluar cambios de color y correlacionarlo con cambios en el contenido de antocianinas usan el sistema  $L^*$  Tono y Croma (Brenes, 2005; Talcott, 2002).

Según McGuire (1992), el Tono y el Croma son aspectos mejor entendidos en la cadena productor-consumidor, esto asociado a que el ojo humano no separa los colores en sus componente sino que lo ve como un todo.

Talcott (2002), para observar cambios en color como función de copigmentación de antocianinas en jugos, utiliza condiciones espectrofotométricas con la cual determina el desplazamiento batocrómico (cambio de la máxima absorbancia en el espectro) causado por cambios en la composición de antocianinas.

#### 3.4.3 Método para determinar las condiciones cromatográficas

Las mejores condiciones cromatográficas fueron obtenida mediante modificaciones de las metodologías cromatográficas usadas por Macz-Pop, 2004 y Choung et al., 2004.

Se generaron dos métodos cromatográficos, uno para identificar antocianinas y otro para identificar agliconas. En el Anexo 3 se puede apreciar la separación de todos los picos de antocianinas (diglucósidos, glucósidos y antocianidinas) y en el Anexo 4 la separación de los picos de agliconas con sus correspondientes condiciones cromatográficas.

#### **3.4.4 Método para desarrollar los modelos lineales de los estándares antocianídicos**

Se usaron entre cuatro a seis niveles en el rango de 1-500 ppm, lo cual según Holden (2004), está dentro de los parámetros aceptado para validar métodos de flavonoles por la USDA (United States Department of Agriculture).

- Se realizaron tres soluciones madre de 1,000 ppm diluyendo estándar en MeOH acidificado a pH=1 con ácido trifluoracético (TFA).
- A partir de cada solución madre se desarrollaron los patrones de antocianinas y agliconas, los cuales fueron inyectados en un volumen de 20  $\mu$ L con las condiciones cromatográficas definidas.
- Con tres repeticiones en cada nivel, se monitoreó la precisión mediante los estadígrafos de la media, desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (%CV) como se muestra en los Anexos 8 y 9. Adicionalmente se monitoreó el comportamiento de la pendiente y el  $R^2$  del modelo lineal mediante el método de cuadrados mínimos.
- Luego de comprobar la linealidad de la curva, las áreas con sus correspondientes concentraciones fueron ingresadas al programa ChemStation Agilent® para generar el modelo lineal  $y=mx+b$  donde  $y$  corresponde al área debajo de la curva,  $m$  a la pendiente,  $x$  a la concentración en ppm y  $b$  al intercepto del modelo lineal.

#### **3.4.5 Método de validación de las curvas de calibración**

Las curvas de calibración fueron validada con concentración conocidas de antocianinas entre el rango de 1 a 500 ppm diferentes a las usadas para la calibración (Anexos 9 y 10). Para comprobar su validez se realizaron pruebas apareadas (prueba t) entre los datos esperados y los datos obtenidos por el HPLC. El nivel de significancia usado para cada prueba t fue del 5% ( $P \leq 0.05$ ).

#### **3.4.6 Método de extracción y purificación de antocianinas**

El método de extracción y purificación se basó en la metodología de Macz-Pop, 2004. Se realizaron mínimas modificaciones para adaptarla a las condiciones existentes en el LAAZ.

- Se extrajo manualmente con un bisturí 0.5 g de testa del grano de frijol.

- Se agregó 50 mL MeOH acidificado con 1% de HCl para favorecer la estabilidad y la extracción de las antocianinas.
- La muestra se molió por 10 min con un polistrón. Se usó hielo para mantener baja la temperatura (10-15 °C).
- Posteriormente, la muestra se mantuvo en un baño ultrasónico por 15 min en ausencia de luz para favorecer la extracción de antocianinas de la matriz celular de la testa. Para evitar sobre-calentamiento se incorporó hielo al baño ultrasónico.
- La muestra se agitó mecánicamente por dos horas en ausencia de luz. La temperatura se mantuvo debajo de 15°C con un mini-intercambiador de calor proveniente del viscosímetro Brookfield. Adicionalmente se agregó hielo al medio acuoso para ayudar al intercambiador de calor.
- Luego de dos horas la muestra fue centrifugada a 8,418g ( $g$ =gravedad) por 5 min. La alícuota se decantó y se guardó a -20°C hasta completar el proceso de extracción.
- Al sólido sobrante se le agregó nuevamente 50 mL de MeOH acidificado con 1% HCl repitiendo el proceso anterior cinco veces más, variando el tiempo de agitación mecánica. Se realizaron tres intervalos de tres horas cada uno, un intervalo de 13 horas y el último de dos horas, completando un total de 26 horas de extracción.
- El conjunto de alícuotas fue filtrado al vacío con una membrana de 0.45  $\mu$ m. Con este último paso se logró eliminar posibles almidones entre otros componentes de interferencia.

**Nota.** La metodología creada por Macz-Pop (2004), realiza el proceso de extracción a temperatura ambiente y no hace mención de controlar la temperatura en el baño ultrasónico, no obstante, es bien conocido que la temperatura es el principal factor afectando la estabilidad las antocianinas (Harborne, 1967; Dao *et al.*, 1998).

- La alícuota filtrada se evaporó completamente en un rotavapor al vacío. La temperatura osciló entre 50-60°C en un tiempo de 2 a 3 horas.

**Nota.** El rotavapor no logró evaporar el metanol a menos de 25°C como lo recomienda la metodología. Esto se debió a escapes del vacío, poca potencia de la bomba y mal estado del rotavapor.

- La muestra desecada se le agregó entre 10 a 20 ml de agua acidifica con TFA (pH=1) y con fuerza mecánica se removió las antocianinas pegadas en la pared del recipiente.
- La muestra concentrada se sometió a un proceso de purificación con el objetivo de eliminar lípidos, carotenoides o clorofilas que podrían interferir con los análisis cualitativos y cuantitativos posteriores. Se hicieron tres lavados seguidos con hexano.

**Nota:** El método propone evaporar nuevamente la muestra con el objetivo de concentrar la muestra a dos ml y eliminar trazas de metanol y hexano.

- El extracto lavado con hexano, fue sometido a otra purificación con un cartucho de separación de fase sólida (ODS C<sub>18</sub>) con el cual se logró separar la muestra de azúcares y ácidos que posteriormente pudieran interferir con el análisis. Antes de purificar la muestra el cartucho fue lavado con tres ml de metanol acidificado con TFA (pH=1) y luego con tres ml de agua acidificada con TFA (pH=1). Posteriormente todo el extracto (10-20 ml) fue filtrado en el cartucho. Las antocianinas retenidas en el cartucho fueron lavadas con suficiente agua y eluidas con cinco ml de metanol acidificado con TFA (pH=1).

**Nota.** Tomando en cuenta la degradación causada a las antocianinas en etapas previas de concentración y la falta de equipo para concentrar nuevamente la muestra, se decidió utilizar el cartucho C<sub>18</sub> como una herramienta de concentración. La muestra purificada se logró concentrar casi dos veces más que la solución purificada del método original; no obstante, se observó pérdidas (no cuantificadas) de pigmentos antocianídicos por sobresaturación del cartucho y trazas de metanol en la solución.

- Una parte de la muestra purificada final (2 ml) fue filtrada a 0.2 µm e inyectada inmediatamente en el HPLC.

### 3.4.7 Método de hidrólisis ácida

Algunos autores expresan antocianinas totales en función de la cantidad total de agliconas obtenidas por hidrólisis ácidas (Espinosa *et al.*, 2006), mientras que otros autores han usado este método para hacer comparaciones de las agliconas con sus correspondientes glucósidos alternos (Talcott, 2002). Sin embargo, otras razones por la cual se hace hidrólisis ácida es la posible presencia de antocianinas aciladas o unida a pentosas u otro tipos de hexosas.

Para esta técnica se siguió la metodología de (Gusti y Wrolstad, 1996), a la cual se le hizo mínimas modificaciones con el objetivo de adaptarla a las condiciones existentes en el LAAZ.

- El extracto final purificado obtenido del paso anterior fue sometido a condiciones ácidas controladas (1 ml de extracto purificado/2 ml HCL 6 N ajustado con MeOH) con el objetivo de romper los enlaces O-Glucósidos sin afectar la estructura del catión flavilio.
- La muestra se mantuvo hirviendo en un baño de agua a 98°C por 40 min y sellado para evitar la evaporación del metanol.
- Finalizado el paso anterior, la muestra se enfrió rápidamente con agua helada a 0°C, filtrada a 0.2 µm e inmediatamente analizada en el HPLC. **Nota.** La metodología

se recomienda utilizar una atmósfera inerte ( $N_2$ ), pero por la falta de  $N_2$  presurizado en el LAAZ se obvió este paso.

### **3.4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados de los análisis se analizaron en el programa estadístico SAS® “Statistical Analysis System v 9.1, 2007”. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con la prueba de separación Tukey y con un nivel de significancia del 5%.

Para validar los modelos lineales de predicción de antocianinas y aglicones se realizó una prueba apareada (prueba t) entre los datos esperados (concentraciones conocidas) y los datos obtenidos de concentración con el HPLC. Se usó un nivel de significancia del 5% ( $P \leq 0.05$ ).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 ANÁLISIS DE PH

El pH de la matriz de la testa, en promedio, fue 5.5 para todas las variedades, lo cual anda dentro del rango que tienen los alimentos. No se encontraron diferencias significativas en pH entre las variedades (Cuadro 5).

Debido a que el grano contiene una actividad de agua bastante baja a diferencia que lo vinos y frutas, se puede asumir que el pH en la testa de frijol no es un factor importante para la estabilidad de las antocianinas a pesar de su valor tan alto.

Cuadro 5. PH de la testa del grano de las variedades Seda, Amadeus-77 y Dorado

<b>Variedad</b>	<b>Media ± DE</b>
Seda	5.53 ± 0.15 <sup>a</sup>
Amadeus-77	5.50 ± 0.1 <sup>a</sup>
Dorado	5.47 ± 0.11 <sup>a</sup>

Valores con letras iguales no son significativamente diferente (prueba Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

Nozzolillo y McNeill (1985), reportaron que las antocianinas se encuentran agrupadas en la capa subepidérmica dentro de un cuerpo celular llamado antocianoplastos, los cuales proveen estabilidad a la molécula de antocianinas. Según Hoshino *et al.* (1981), la manera en que las antocianinas pueden mantenerse estables a pH tan alto sin afectar su estructura y convertirse a formas incoloras es por la auto-asociación y copigmentación creada por puentes de hidrógenos y atracciones hidrofóbicas entre los núcleos flavilio, lo cual es lo más probable que suceda en la testa.

La presencia de flavonoles, taninos y polipéptidos también estabilizan las antocianinas. Espinosa (2006), encontró cantidades variables de flavonoles, taninos y ácidos fenólicos en frijoles, lo cual indica también la alta probabilidad de que dichos compuestos influyan en la estabilidad de las antocianinas.

## 4.2 ANÁLISIS DE COLOR

Se encontraron diferencias significativas en todos los parámetros de color (Cuadro 6), lo cual concuerda con los resultados presentados por Melgar en el 2004, quién evaluó estas variedades en el Colorflex. Se esperaría encontrar diferencias estadísticas para el contenido de antocianinas, ya que éstas están relacionadas directamente con el color (Wong, 1995).

Cuadro 6. Separación de medias para los atributos de color.

Variedad	L*	Tono <sup>1</sup>	Croma <sup>2</sup>	a* <sup>3</sup>	b* <sup>4</sup>
Seda	25.92±2.0 <sup>a</sup>	25.58±4.1 <sup>a</sup>	23.59±1.8 <sup>a</sup>	21.2±1.3 <sup>a</sup>	10.2±2.1 <sup>a</sup>
Amadeus-77	24.05±2.4 <sup>b</sup>	22.12±2.8 <sup>b</sup>	19.55±1.9 <sup>b</sup>	18.1±1.5 <sup>b</sup>	7.43±1.6 <sup>b</sup>
Dorado	18.96±0.9 <sup>c</sup>	17.39±2.6 <sup>c</sup>	9.06±2.2 <sup>c</sup>	8.6±2.0 <sup>c</sup>	2.78±1.0 <sup>c</sup>

Valores con letras diferentes en cada columna son significativamente diferentes (prueba Tukey, P≤0.05).

<sup>1</sup> Tono o ángulo del color =  $\tan^{-1}(b^*/a^*)$ . Indica que tanto es un color.

<sup>2</sup> Croma o hipotenusa del color =  $(a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$ . Indica que tan puro es el color.

<sup>3</sup> Componente a\*: Valores positivo (rojo), valores negativo (verde).

<sup>4</sup> Componente b\*: Valores positivo (amarillo), valores negativos (azul).

La variedad más clara fue Seda y la más oscura Dorado. Para el color separado en sus componentes a\* y b\* seda fue más rojo y amarillo que Amadeus-77 y éste más que Dorado.

En cuanto a pureza (croma) Seda tuvo el rojo más puro y Dorado el menos puro.

Por el tono, todas las variedades estuvieron en el cuadrante 1 de la escala triple estímulo L\*a\*b, lo cual a su vez significa que estuvieron entre el eje rojo y amarillo con tono rojizo. La variedad Dorado presentó un tono más rojizo que Amadeus-77 y Seda. Esto se explica por el componente b\* (amarillo) el cual fue mayor en Seda y menor en Dorado.

## 4.3 CURVAS DE CALIBRACIÓN

Se obtuvieron nueve curvas para predecir el contenido de antocianinas y cinco curvas para predecir el contenido de agliconas en la testa del frijol. Todas tuvieron un ajuste lineal arriba de 0.999 (Cuadro 7 y 8), cumpliendo con la norma establecida por Holden (2004) para la USDA para aceptar métodos de flavonoles.

En la validación no se encontró diferencias significativas entre el valor esperado y el valor obtenido por el HPLC (Cuadro 7 y 8), razón por la cual se concluyó que las curvas son confiables para predecir los compuestos de interés.

La mayor absorbancia se determinó analizando el espectro UV-VIS (200-700 nm). Dichos resultado presentaron mínimas variaciones con las encontradas por Macz-Pop (2004) y Choung *et al.*, (2004), lo cual puede deberse a diferencias por el detector y el pH usados.

Todas la antocianidinas y sus contraparte glucosiladas presentaron un comportamiento característico en el espectro que concuerda con el comportamiento encontrado por Macz-Pop (2004), donde en el rango UV-visible la mayor absorbancia estuvo en el rango ultravioleta (260-280 nm) y en el rango visible (500-550 nm). Dicho comportamiento fue importante en la predicción de posibles antocianinas adicionales a los estándares.

Aunque se reportó tiempo de retención de cada compuesto (Cuadro 8 y 9) es recomendable según el protocolo de manejo del HPLC Agilent 1100 correr el/los estándar/es para comprobar que el tiempo de elusión no ha cambiado.

Cuadro 7. Modelos lineales para predecir antocianinas.

Antocianina	M <sup>ab</sup>	b <sup>c</sup>	R <sup>2</sup>	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) <sup>d</sup>	TR <sup>e</sup>	Valor (t)	(Pr > t) <sup>f</sup>
Cy 3, 5 digluc	35.58	-18.45	0.9996	512-276	6.20±1.7	2.08	0.18
Pg 3,5 digluc	34.12	-80.14	0.9997	504-2268	8.75±1.0	1.58	0.25
cy 3 gluc	38.45	-21.59	0.9995	514-280	13.60±1.2	1.11	0.38
pg 3 gluc	28.00	-6.32	0.9998	502-278	19.20±1.3	1.96	0.19
Pn 3 gluc	47.10	33.08	0.9998	520-278	23.35±1.0	0.98	0.43
Mv 3 gluc	35.70	47.54	0.9999	526-278	26.50±1.3	1.02	0.49
cy	71.46	-120.85	0.9997	522-274	33.39±0.5	1.01	0.42
pg	71.36	-53.65	0.9997	512-268	39.20±0.2	0.98	0.50
pn	46.70	24.34	0.9998	524-274	43.30±0.8	1.89	0.15

<sup>a</sup> Pendiente del modelo lineal

<sup>b</sup> La variable dependiente es el **área (y)**, la variable independiente es **ppm (x)**

<sup>c</sup> Intercepto del modelo lineal

<sup>d</sup> Longitud de onda de mayor de absorbancia en el rango 500-550 nm y en el rango 250-280 con 0.1% TFA

<sup>e</sup> TR=Tiempo de Retención para cada antocianina y su desviación estándar

<sup>f</sup> Con probabilidad mayor a 0.05 no existe diferencia significativa

No se generó la curva de calibración de malvidina por limitante en la cantidad de estándar, además ningún autor ha reportado malvidina en forma natural en frijol. No obstante, se observó dentro de las pruebas preliminares un pico con el mismo tiempo de retención que malvidina, por lo cual fue necesario contar con un modelo para cuantificarle. Para poder cuantificar dicho compuesto se recurrió a utilizar la curva de calibración obtenida para él método cromatográfico de agliconas **Área=66.98 (ppm)+35.28** (Cuadro 8).

Cuadro 8. Modelos lineales para predecir agliconas.

Aglicona	m <sup>ab</sup>	b <sup>c</sup>	R <sup>2</sup>	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) <sup>d</sup>	TR <sup>e</sup>	Valor (t)	(Pr > t) <sup>f</sup>
Df	52.26	-20.79	0.9997	528-274	9.2±0.8	0.47	0.68
Cy	65.67	-136.27	0.9999	524-276	15.0±1.2	-1.57	0.25
Pg	67.89	-160.57	0.9998	512-268	23.3±0.9	1.33	0.41
Pn	47.90	-61.65	0.9999	524-274	27.6±1.3	-0.09	0.93
Mv	66.98	35.28	0.9999	532-274	30.0±1.5	2.94	0.20

<sup>a</sup> Pendiente del modelo lineal

<sup>b</sup> La variable dependiente es el **área (y)**, la variable independiente es **ppm (x)**

<sup>c</sup> Intercepto del modelo lineal

<sup>d</sup> Longitud de onda de mayor de absorbancia en el rango 500-550 nm y en el rango 250-280 con 0.1% TFA

<sup>e</sup> TR=Tiempo de Retención para cada antocianina y su desviación estándar

<sup>f</sup> Con probabilidad mayor a 0.05 no existe diferencia significativa

## 4.4 ANÁLISIS DE ANTOCIANINAS

### 4.4.1 Análisis de perfil de antocianinas

Se encontró la presencia de Pg 3-gluc y Cy 3-gluc en todas las variedades (Seda, Amadeus-77 y Dorado), lo cual concuerda con Choung *et al.*, (2004) y Macz-Pop (2004), quienes reportaron dichas antocianinas como las principales en frijoles rojos. Seda presentó una antocianina adicional Pg 3,5-digluc (Figura 7). Se observó también la presencia de antocianidinas en todas las variedades al igual que Macz-Pop (2004) pero en mayor cantidad (Figura 7, 8 y 9).

Se observó la presencia de un pico adicional no identificado (Figura 7, 8 y 9) y fue común a todas las variedades. Se infirió que podría ser petunidina, ya que presentó un tiempo de elusión entre cianidina y pelargonidina y presentó un espectro similar al de las antocianinas (Figura 6). La presencia de petunidina se puede comprobar mediante la polaridad de las antocianidinas como lo planteada (Kong, 2003; Zhang, 2001). Queda la posibilidad que dicha molécula sea una antocianina acilada, por lo cual se sometieron las muestras a hidrólisis ácidas para romper los enlaces glucosídicos y liberar todas las agliconas (Figura 10).

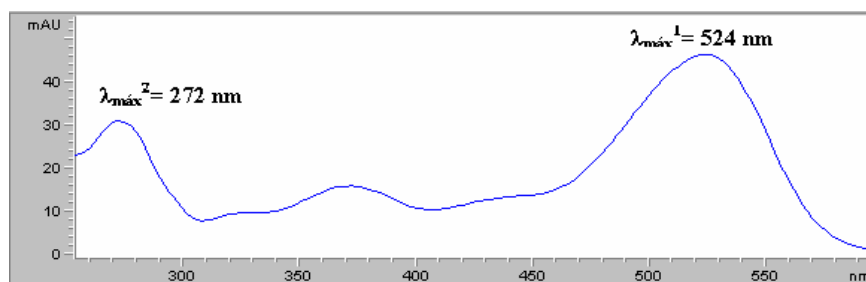


Figura 6. Espectro de absorbancia en el rango UV-VIS del pico no identificado.

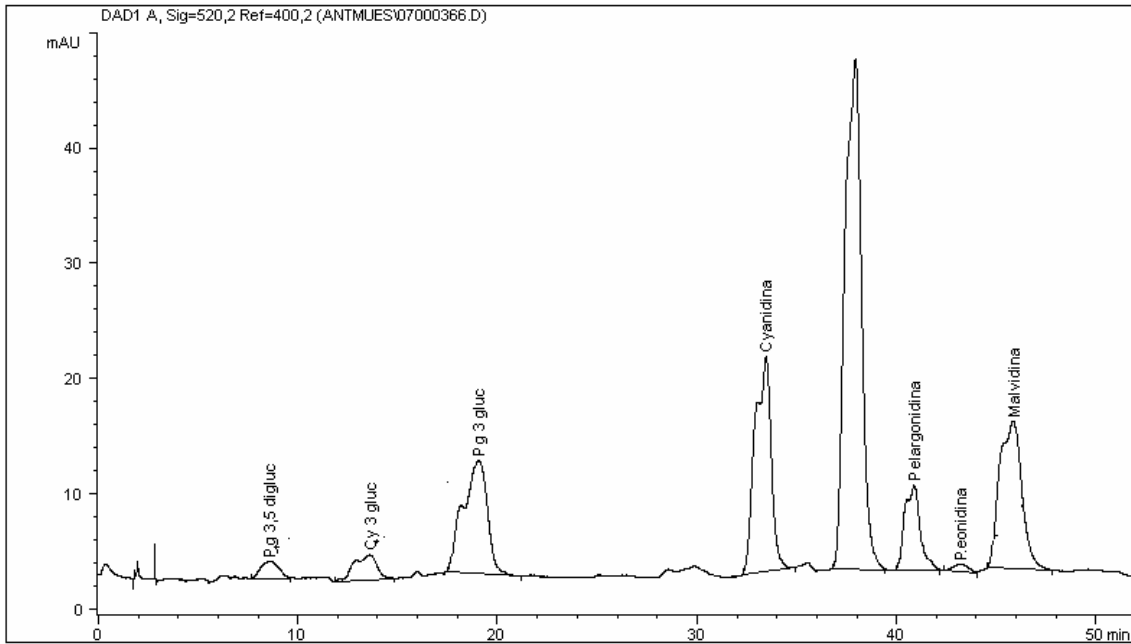


Figura 7. Cromatograma de antocianinas en la variedad Seda.

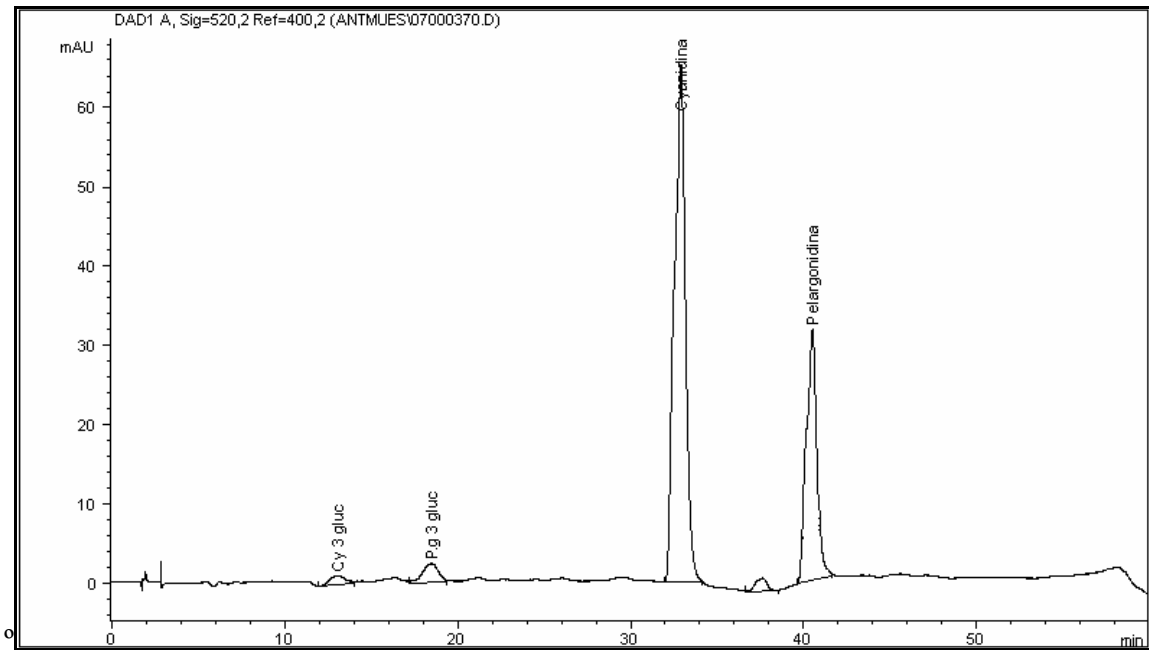


Figura 8. Cromatograma de antocianinas en la variedad Amadeus-77.

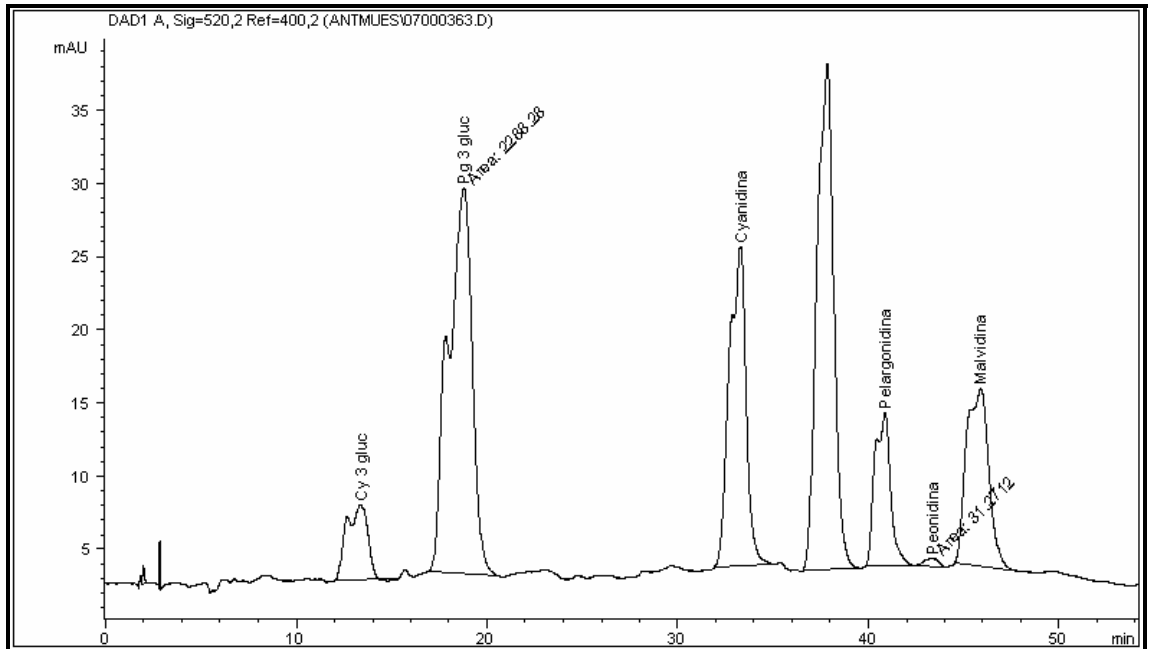


Figura 9. Cromatograma de antocianinas en la variedad Dorado.

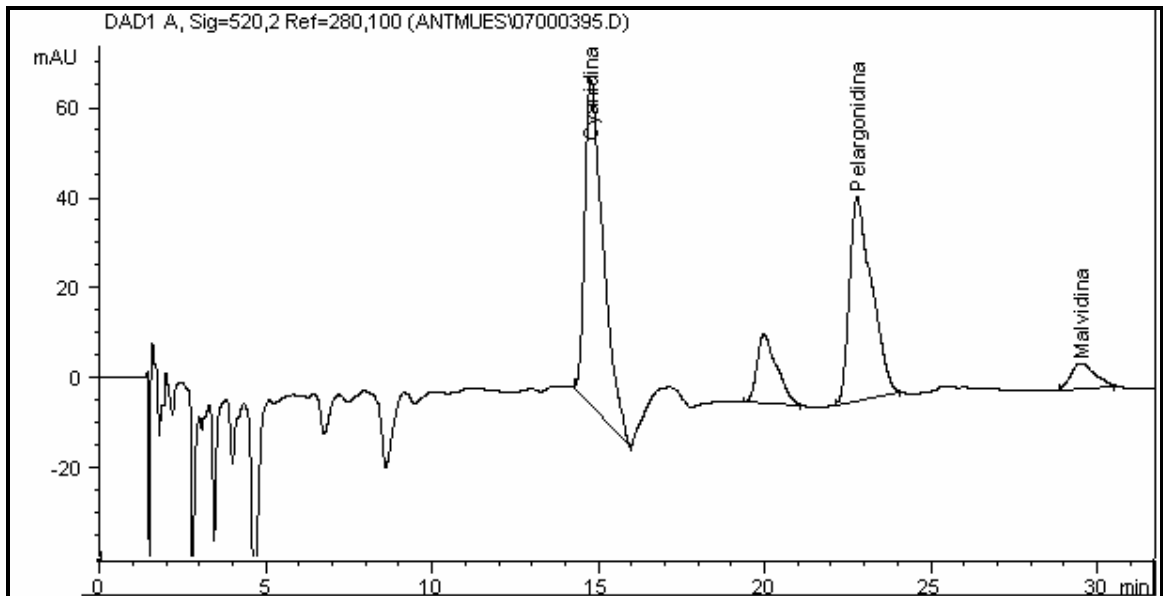


Figura 10. Cromatograma de agliconas para identificar petunidina en la variedad Seda.

Luego de la hidrólisis ácida (Figura 10) el pico identificado correspondió al orden de salida de las agliconas planteado por (Kong, 2003 y Zhang, 2001), con lo cual se puede concluir que dicho compuesto es petunidina y no una antocianina acilada.

Con respecto al área total promedio de todas las variedades petunidina representó 36.7, 2.7 y 20.9% de los cromatograma de Seda, Amadeus y Dorado, respectivamente (Cuadro 9). Esto indica que petunidina representó el segundo aglicón más abundante en Seda y Dorado.

Cuadro 9. Perfil de antocianinas y antocianidinas en las variedades estudiadas.

Perfil	Variedad		
	Seda (%)	Amadeus (%)	Dorado (%)
Pg 3,5 digluc	0.8	-	0.1
cy 3 gluc	3.7	1.8	2.2
pg 3 gluc	19.2	6.2	15.0
Cianidina (Cy)	17.0	55.1	41.4
Petunidina (Pt)	36.7	2.7	20.9
Pelargonidina (Pg)	7.5	34.3	8.6
Peonidina (Pn)	0.4	-	0.1
Malvidina (Mv)	14.6	-	11.6
Agliconas <sup>a</sup>	76.0	92.0	83.0
Glucósidos <sup>b</sup>	23.7	7.9	17.3

<sup>1</sup>Promedio de tres repeticiones y porcentaje basado en el área total de los cromatogramas.

<sup>a</sup>Agliconas: Cy, Pt, Pg, Pn y Mv.

<sup>b</sup>Glucósidos: Pg 3,5-digluc, Cy 3,5-gluc y Pg 3,5-gluc.

El perfil determinado para las variedades Seda, Amadeus-77 y Dorado concuerda con otros estudios en frijol rojo (Choung *et al.*, 2004 y Macz-Pop, 2004), tomando en cuenta sólo los diglucósidos. El perfil según Choung *et al.* (2004), está influenciado por la variedad, por lo cual el perfil puede cambiar.

Cuadro 10. Tabla comparativa de perfiles antocianídicos de las variedades estudiadas con otros estudios en frijol rojo.

Nivel	Choung 2004	Macz-Pop 2004	Seda	Amadeus-77	Dorado
1	Pg 3-gluc	Pg 3-gluc	Pt	cy	Cy
2	Cy 3,5-digluc	Cy 3-gluc	Pg 3 gluc	Pg	Pt
3	Df 3-gluc	Cy 3, 5-digluc	Cy	pg 3 gluc	pg 3 gluc
4	Cy 3-gluc	Cy	Mv	Pt	Mv
5		Pg 3,5-digluc	Pg	cy 3-gluc	Pg
6		Pn	cy 3 gluc		cy 3 gluc
7		Pg	Pg 3,5-digluc		Pg 3,5 digluc
8			Pn		Pn
Color	Rojo	Rojo	Rojo claro	Rojo intermedio	Rojo oscuro

Nivel 1 representa la antocianina en mayor cantidad y el nivel 8 la antocianina en menor cantidad.

El mayor porcentaje del área encontrada en los cromatogramas correspondió a agliconas (Cuadro 9). No obstante, a pesar de que este estudio concuerda con Macz-Pop (2004), quien encontró agliconas de formas libres en frijol rojo, hay que tomar en cuenta que ninguna otra investigación ha reportado agliconas libres y Macz-Pop (2004) reportó el 18% de su cromatograma antocianídicos como agliconas, mientras que este estudio está reportando 76, 92 y 86% de agliconas en forma natural para las variedades Seda, Amadeus-77 y Dorado respectivamente.

Se asumió que la razón básica por la cual se obtuvo tan alta presencia de agliconas en forma natural se debió al uso de temperaturas encima de 55°C en la etapa de concentración. Dichas temperaturas probablemente causaron hidrólisis térmica de los enlace O-glucosídico de las antocianinas dejando libre las agliconas.

Se consideraron otros factores que pudieran causar hidrólisis de las antocianinas como la acidez empleada para estabilizar las antocianinas (1% de HCl). Sin embargo, es descartable considerar hidrólisis por efecto del HCl, ya que muchos estudios (Dao *et al.*, 1998; Merken *et al.*, 2001) han encontrado que para generar hidrólisis de las antocianinas es necesario tener más de 1.2 M de HCl y en el caso de este estudio se usó 0.12 M de HCl.

También es descartable la posibilidad de que el HCl se concentró en la muestra, ya que tiene un punto de ebullición menor que el MeOH.

Otra posibilidad, la cual podría justificar la presencia de dichas agliconas, es la posible hidrólisis enzimática por acción de B-glucosidasa. Esta enzima es capaz de romper el enlace O-glucósido de las antocianinas, liberando agliconas, las cuales son rápidamente destruidas, sin embargo, Whightman y Wrostad (1996), indicaron que la acción de esta enzima produce la degradación de las antocianinas sin formar agliconas. Además, varios autores (Mateo y Di Stefano, 1997; por ejemplo) indicaron que a pH debajo de 1 la actividad enzimática es retenida. En el caso de nuestro estudio se trabajó con suficiente acidez (1% HCl), por lo cual la actividad enzimática no podría ser el origen de lo las agliconas libres.

Todas las razones antes descritas, indican que la única causa potencial en la presencia de agliconas en este estudio fue por hidrólisis térmica, por lo cual hay que expresar el perfil de antocianinas según sus correspondientes glucósidos.

Dentro de los glucósidos sobrantes sin hidrolizarse completamente, el que estuvo en mayor cantidad fue Pg 3-gluc para todas las variedades (Cuadro 10). Se puede asumir que para todas las variedades Pg 3-gluc fue la antocianina principal; se puede concluir esto por la estabilidad de las antocianinas, ya que según Kong (2003) y Zhang (2002) comprobaron que el orden de estabilidad es Df < Pg < Cy < Pt < Pn < Mv. Por tanto, a medida Pg 3-gluc se hidrolizaba, sucedía lo mismo con Cy 3-gluc (el segundo glucósido más abundante); pero como Cy es más estable que Pg, Pg se descompuso a una tasa mayor que Cy y resultó en que Cy al final quedara con mayor cantidad cuantificable. Para comprobar lo antes inferido, se procedió hacer la hidrólisis ácida de las muestras, en la cual las agliconas más susceptibles al calor se degradarían a una mayor tasa que las

agliconas más estables y se liberarían las agliconas correspondientes a sus formas glucósidas.

Cuadro 11. Cantidad porcentual de agliconas antes de la hidrólisis ácida.

<b>Agliconas</b>	<b>Seda (%)</b>	<b>Amadeus-77 (%)</b>	<b>Dorado (%)</b>
Cianidina	22.37	59.89	49.88
Petunidina	48.29	2.93	25.18
Pelargonidina	9.87	37.28	10.36
Peonidina	0.53		0.12
Malvidina	19.21		13.98

Porcentaje del área promedio de tres repeticiones

Cuadro 12. Cantidad porcentual de agliconas luego de la hidrólisis ácida.

<b>Agliconas</b>	<b>Seda (%)</b>	<b>Amadeus-77 (%)</b>	<b>Dorado (%)</b>
Cianidina	54	62	50
Petunidina	16	5	14
Pelargonidina	26	33	32
Malvidina	4	0.5	4

Porcentaje del área promedio de tres repeticiones

Como malvidina (Mv), petunidina (Pt) y peonidina (Pn) no tienen sus correspondientes glucósidos como el caso de pelargonidina (Pg) y cianidina (Cy) , ellos tendieron a bajar su cantidad relativa luego de la hidrólisis (Cuadro 11 y 12)

En el caso de Cy y Pg, quienes tenían sus correspondientes glucósidos (glucósidos de Pg en mayor cantidad que los glucósidos de Cy), estuvieron regenerándose del glucósido a medida se destruían; pero la tasa en la cual se destruyeron nuevamente fue mayor en Pg que en Cy razón por la cual al final se obtuvo mayor contenido de Cy.

En las variedades Seda, Amadeus-77 y Dorado las principales antocianinas fueron las pelargonídicas seguido por las cianídicas y luego por las petunídicas.

Cuadro 13. Perfiles antocianídicos encontrados en las variedades estudiadas.

Nivel	Seda	Amadeus	Dorado
1	Perladonídicas	Perladonídicas	Perladonídicas
2	Cianídicas	Cianídicas	Cianídicas
3	Petunídicas	Petunídicas	Petunídicas
4	Malvinídicas		Malvinídicas
5	Peonídicas		Peonídicas

Cada tipo de antocianina puede incluir su correspondiente glucosilado o acilado derivado.

Nivel 1 representa la antocianina en mayor cantidad y el nivel 5 la antocianina en menor cantidad.

En la Figura 7, 8 y 9 se puede observar picos con ciertas anomalías, lo cual se explica por degradación de las antocianinas. Posibles compuestos intermedios a la degradación están interfiriendo con la forma de los picos. En consecuencia, la cuantificación de antocianinas en este estudio no es confiable.

#### 4.4.2 Contenido de antocianinas totales

Las cantidades de antocianinas encontradas en las variedades de Seda, Amadeus-77 y Dorado (Cuadro 14), fueron menores a las obtenidas por Choung *et al.*, (2004), en frijol rojo, y por Macz-Pop, (2004), en la variedad de frijol rojo Tolosa (Cuadro 15), lo cual se debió al efecto de la temperatura y por posible efecto de la variedad utilizada.

Cuadro 14. Contenido de antocianinas en la testa y en el grano.

Variedad	%	mg/100g <sup>1</sup>	Contenido de antocianinas 100 mg/g <sup>ab</sup>								
			Testa	grano	1	2	3	4	5	6	7
Seda	8.9	7.4		3.7	6	39.4	15.2	6.7	0.3	12	83.3
Amadeus-77	9.4	6.3			2.5	9.5	34.2	21			67.2
Dorado	10.4	10.0		3	10.4	31	35.1	7.7		9.5	96.7

<sup>a</sup> Pg 3,5-digluco, Cy 3-gluco, pg 3-gluco, cy, pg, pn, mv son 1, 2, 3, 4, 5,6 y 7 respectivamente.

<sup>1</sup> Contenido total de antocianinas en el grano de frijol entero calculado a partir del % de la testa.

<sup>b</sup> Contenido promedio de tres repeticiones.

Es importante notar que muchas publicaciones acerca de antocianinas en *Phaseolus vulgaris* L. (Cuadro 2), presentan resultados diferentes, lo cual puede ser explicado porque la composición del grano está influenciado por factores geográficos, genotípicos, tiempo de acondicionamiento y tiempo en almacenado. En este documento los resultados sólo hacen referencia a las variedades de Amadeus-77, Seda y Dorado cultivadas en Honduras.

#### 4.4.3 Comparación estadística del contenido total de antocianinas entre las variedades Dorado, Amadeus-77 y Seda

No se encontraron diferencias estadísticas entre las variedades Seda, Amadeus-77 y Dorado, lo cual se debió en parte a la alta variabilidad en el método de extracción (variabilidad de tiempos de evaporación y temperaturas). Otras fuentes de variación pudieron haber sido la localidad, sin embargo, no se puede inferir de donde viene la variabilidad principal. En el Cuadro 16, se puede observar con la desviación estándar que la variación fue alta lo cual pudo enmascarar las diferencias entre las variedades.

Cuadro 15. Comparación estadística del contenido total de antocianinas.

<b>Variedad</b>	<b>Área media <math>\pm</math> DE</b>
Seda	5799 <sup>a</sup> $\pm$ 2292.2
Amadeus-77	5763 <sup>a</sup> $\pm$ 3419.6
Dorado	4241 <sup>a</sup> $\pm$ 1711.6

Valores con letras iguales no son significativamente diferente (prueba Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

Comparación basada en el área total debajo de la curva.

No se comparó estadísticamente con el contenido total de antocianinas por la presencia de petunidina.

## 5. CONCLUSIONES

- Se definieron dos métodos cromatográficos con 14 modelos lineales, nueve para predecir el contenido de antocianinas y cinco para predecir agliconas.
- La variedad Amadeus-77 tuvo un patrón de tres tipos de antocianinas (pelargonídicas, cianídicas y petunídicas), mientras que las variedades Seda y Dorado comparten un patrón común de cinco tipos de antocianinas (pelargonídicas, cianídicas petunídicas, malvinídicas y peonídicas).
- No se encontraron diferencias significativas en el contenido de antocianinas en las variedades Seda, Amadeus-77 y Dorado.
- Con la metodología desarrollada para determinar el pH en la testa del frijol, se determinó que el pH de las variedades estudiadas fue 5.5.

## **6. RECOMENDACIONES**

- Repetir la extracción y cuantificación de antocianinas en las tres variedades y tres localidades usando el equipo de concentración adecuado.
- Enfocar estudios en la caracterización de otros compuestos que interfieran con la estabilidad y la expresión del color de las antocianinas (flavonoles totales, taninos totales, taninos condensados, pro-antocianina específica, catequinas, entre otros).
- Realizar una nueva calibración con estándares nuevos de antocianinas. Para dicha calibración utilizar 0.3% de TFA para acidificar la fase móvil, ya que con éste se observó mejor resolución y mayor área debajo de la curva a una misma concentración, lo cual implica mejorar el límite de detención.
- Hacer curva de calibración para petunidina y sus correspondientes glucósidos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Anderson, O., y Francis, G. 2004. Techniques of pigment identification. *Annual Plant Reviews—Plant Pigments and Their Manipulation*, 14, 293–341.

Awika, M., 2004. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry* 90 293–30.

Baldi, A., y Romani, A. (1992). Studio su alcuni composti polifenolici in uve, mosti, vini della Toscana (Study on selected polyphenolic compounds of grape, must and wine from Tuscany). *Enotecnico*, 28, 105–119.

Boulton, R., Neri, R., Levengood, J., y Vaadia, M. (1999). Copigmentation of anthocyanins in Cabernet Sauvignon and Merlot wines from the Napa valley of California. In A. Lonvaud-Funel (Ed.), *Proceedings of the 6th symposium international d'oenologie*. Paris, France: Technic y Doc. 35–38

Brenes, C; Pozo-Insfran, D y Talcott, S. 2005. Stability of Copigmented Anthocyanins and Ascorbic Acid in a Grape Juice Model System. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3395-3400.

Brouillard, R. 1982. Chemical structure of anthocyaninins. In P. Markakis (Ed.), *Anthocyaninins as food color*. London: Academic Press. Pag. 1–40.

Buldini, P. L., Ricci, L., y Sharma, J. L. (2002). Review: recent applications of sample preparation techniques in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 975, 47–70.

Chandra, A., Rana, J., y Li, Y. (2001). Separation, identification, quantification and method validation on anthocyaninins in botanical supplement raw material by HPLC and HPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3515–3521.

Choung, C. 2004. Anthocyanins profiles of Korean kidneys beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal Agriculture of Food Chemistry* 24:740-743.

Dao, L; et al. 1998. Improved Method for the Stabilization of Anthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* 46, 3564-3569.

- Espinosa L. 2006. Polyphenols in Wild and Weedy Mexican Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 54 (12), 4436 -4444.
- García-Viguera, C., Zafrilla, P., Tomás-Barberá n, F.A., 1998. The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit. *Phytochemical Analysis* 9, 274–277.
- Giusti, M.M., Luis, E.R.-S., James, R. 1998. Anthocyanin pigments composition of red radish cultivars as potential food colorant. *Journal of Food Science* 63, 219–224.
- Gusti, M. M., y Wrolstad, R. (1996). Characterization of red radish anthocyaninins. *Journal of Food Science*, 61, 322–326.
- Harborne, J.; Williams, C. 2001. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rept.* 18, 310–333
- Harborne, J. y Grayer, R. 1988. The anthocyaninins. In J. B. Harborne (Ed.), *The flavonoids* (pp. 1–20).
- Holden, J. 2004. Development of a database of critically evaluated flavonoids data: application of USDA's data quality evaluation system. *J. Food Comp. Anal.* 15(4), 339-348.
- Hong, V., y Wrolstad, R. E. (1990). Characterization of Anthocyanin containing colorants and fruits juices by HPLC/photodiode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 698–708.
- Hoshino, T., Matsumoto, U., and Goto, T. 1981. Self-association of some anthocyanins in neutral aqueous solution. *Phytochemistry* 20, 1971-1976.
- Kong, J.M.; Chia, L.S.; Goh, N.K.; Chia, T.F.; Brouillard, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64, 923-933.
- Macz-Pop, G. 2005. Natural occurrence of free anthocyanin aglycones in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Chemistry* 94:448-456.
- Martel, P., 1995. A socio-economic study of the Honduran bean subsector: production characteristics, adoption of improved varieties, and policy implications. Ph. D. Dissertation. Department of Agricultural Economics, Michigan State University, East Lansing, MI. 150p.
- Martínez, L., Bernsten, R. y Zamora, M. 2004. Estrategias de mercado para el frijol centroamericano. *Agronomía Mesoamericana* 15(2):121-130.
- Mateo, J., y Di Stefano, R. (1997). Description of the b-glucosidase activity of wine yeast. *Food Microbiology*, 14, 583–591.

McGuire, G. R. 1992. Reporting of objective color measurements. *HortScience* 27(12): 1254-1255.

Merken, H. M., Merken, C. D., y Beecher, G. R. (2001). Kinetics for the quantitation of anthocyanidin, flavonols and flavones in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2727–2732.

Moreno-Yolanda, S. 2004. Composición de antocianinas en variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en México. *AGROCIENCIA*. 39: 385-394.

Nozzolillo, C., and J. McNeil. 1985. Anthocyanins pigmentation in seedlings selected species of *Phaseolus* and *Vigna* (Fabaceae). *Can. J. Bot.* 63: 1066-1071

Okita, C.; Kazuko, S.; Kazuko, Y.; Hamaguchi, Y. Anthocyanins of *Phaseolus Vulgaris*, cv. Kurodanekinugasa. *Eiyo To Shokuryo* 1972, 25, 427-430.

Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., y Rivas-Gonzalo, J. C. (2000). Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5331–5337.

Revilla, E., Ryan, J.M., Martí n-Ortega, G., 1998. Comparison of several Several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4592–4597.

Riberau-Gayon, P. (1985). The chemistry of red wine color. In A. D. Webb (Ed.). *The Chemistry of Winemaking* (Vol. 137, pp. 50–87).

Rivas-Gonzalo, J. (2003). Analysis of anthocyaninins. In C. Santos- Buelga y G. Williamson (Eds.), *Methods in polyphenol* (pp. 338–358).

Rivas-Gonzalo, J. C., Gutierrez, Y., Hebrero, E., y Santos-Buelga, C. (1992). Comparison of the methods for the determination of anthocyanins in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43, 210–214.

Somers, T. C. (1998). *The wine spectrum*. Marleston, SA, Australia: Winetitles. . J. *Agric. Food Chem.* ..45, 3300-3325.

Stanton, W. R.; Francis, B. J. Ecological significance of anthocyanins in the seed coats of the Phaseoleae. *Nature* 1966, 211, 970-971.

Strack, D., y Wray, V. 1993. The anthocyaninins. In J. B. Harborne (Ed.), *The flavonoids: Advances in research since 1986* (pp. 1–22).

Takeoka, G. R.; Dao, L. T.; Full, G. H.; Wong, R. Y.; Harden, L. A.; Edwards, R. H.; Berrios, J. D. J. 1997. Characterization of black bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3395-3400.

Talcott S; LEE J, 2002. Ellagic Acid and Flavonoid Antioxidant Content of Muscadine Wine and Juice. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3186-3192

Taleón, V. 2005. Efecto de la temperatura de almacenamiento en la estabilidad del color del grano de frijol rojo Víctor. Proyecto Especial de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria. Zamorano, Honduras. 46 p.

Tomás-Barberán, F.A.; Clifford, M.N. Review: flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agr.* 2000, 80, 1073-1080.

Wong. D. (1995). Química de los alimentos, Mecanismos y Teorías. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España. 165-174 p.

Yoshida, K., Y. Sato, R. Okuno, K. Kameda, M. Isobe, and T. Kondo. 1996. Structural analysis and measurements of anthocyanins from coloured seed coats of Vigna, Phaseolus and Glycine legumes. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(4): 589-593.

Zhang, Z.Q.; Pang, X.Q.; Ji, Z.L.; Jiang, Y.M. Role of anthocyanin degradation in litchi pericarp browning. *Food Chem.* 2001, 75, 217-221.

## **8. ANEXOS**

**Anexo 1.** Condiciones cromatográficas para separar antocianinas.**• Fase estacionaria:**

- Columna analítica Zorbax SB-C<sub>18</sub> (250mm×46 mm×5 μm).
- Precolumna C<sub>18</sub> con el objetivo de incrementar la vida útil de la columna.
- Detector de arreglo de diodo (DAD).

**• Fase móvil:**

- Agua acidificada con 0.1% de TFA (v/v) como fase (A).
- Acetonitrilo grado HPLC con 0.035% ácido fórmico (v/v) como fase (B).

**• Gradiente:**

- 10–11% de B en 12 min.
- 11-12% en 8 min.
- 12-13% en 5 min.
- 13-18% en 10 min.
- Mantenido por 25 min al 18% de B.

**• Volumen de inyección:**

- 20 μL.

**• Flujo:**

- Un ml/min.

**• Longitud de onda usada para todas las antocianinas:**

- 520 nm.

**• Temperatura:**

- 35°C.

**Anexo 2.** Condiciones cromatográficas para separar antocianidinas.**• Fase estacionaria:**

- Columna analítica Zorbax SB-C<sub>18</sub> (250mm×46 mm×5 μm).
- Precolumna C<sub>18</sub> con el objetivo de incrementar la vida útil de la columna.
- Detector de arreglo de diodo (DAD).

**• Fase móvil:**

- Agua acidificada con 0.1% de TFA (v/v) como fase (A).
- Acetonitrilo grado HPLC con 0.035% ácido fórmico (v/v) como fase (B).

**Gradiente:**

- 14–18% de B por 20 min.
- Mantenido por 15 min al 18% de B.

**• Volumen de inyección:**

- 20 μL.

**• Flujo:**

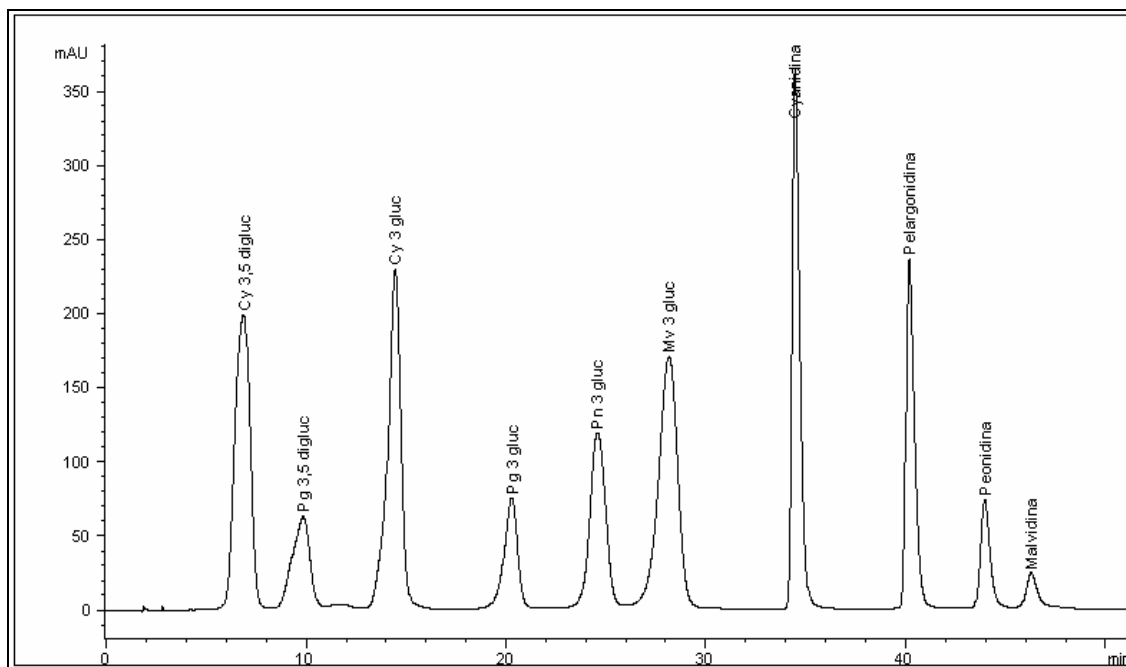
- Un ml/min.

**• Longitud de onda usada para todas las antocianinas:**

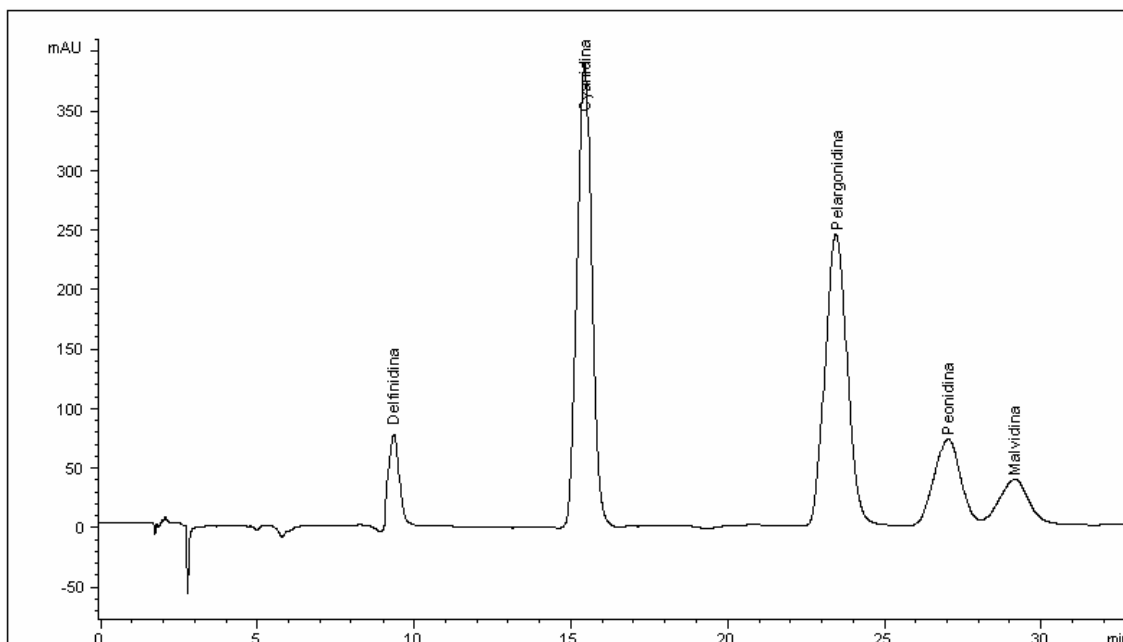
- 520 nm.

**• Temperatura:**

- 35°C.

**Anexo 3.** Cromatogramas de estándares puros de antocianinas.**Condiciones cromatográficas:**

- **Fase estacionaria:** Columna analítica Zorbax SB-C<sub>18</sub> (250mm×46 mm×5 μm) con una precolumna C<sub>18</sub>. Detector DAD.
- **Fase móvil:** Agua acidificada con 0.1% de TFA (v/v) como fase (A) y Acetonitrilo grado HPLC con 0.035% ácido fórmico (v/v) como fase (B).
- **Gradiente:** 10–11% B por 12 min, 11–12% por 8 min, 12–13% por 5 min, 13–18% por 10 min y mantenida por 25 min a 18% con un flujo de 1 ml/min y manteniendo la temperatura constante a 35°C. Se monitoreó a 520 nm todos los compuestos.
- **Volumen de inyección:** 20 μL.

**Anexo 4.** Cromatograma de estándares puros de antocianidinas.**Condiciones cromatográficas:**

- **Fase estacionaria:** Columna analítica Zorbax SB-C<sub>18</sub> (250mm×46 mm×5 μm), precolumna C<sub>18</sub> y detector DAD.
- **Fase móvil:** Agua acidificada con 0.1% de TFA (v/v) como fase (A) y acetonitrilo grado HPLC con 0.035% ácido fórmico (v/v) como fase (B).
- **Gradiente:** 14–18% B por 20 min y mantenida por 10 min a 18% con un flujo de 1 ml/min y manteniendo la temperatura constante a 35°C. Se monitoreó a 520 nm todos los compuestos.
- **Volumen de inyección:** 20 μL.

**Anexo 5.** Observaciones al determinar las condiciones cromatográficas para antocianinas y para agliconas.

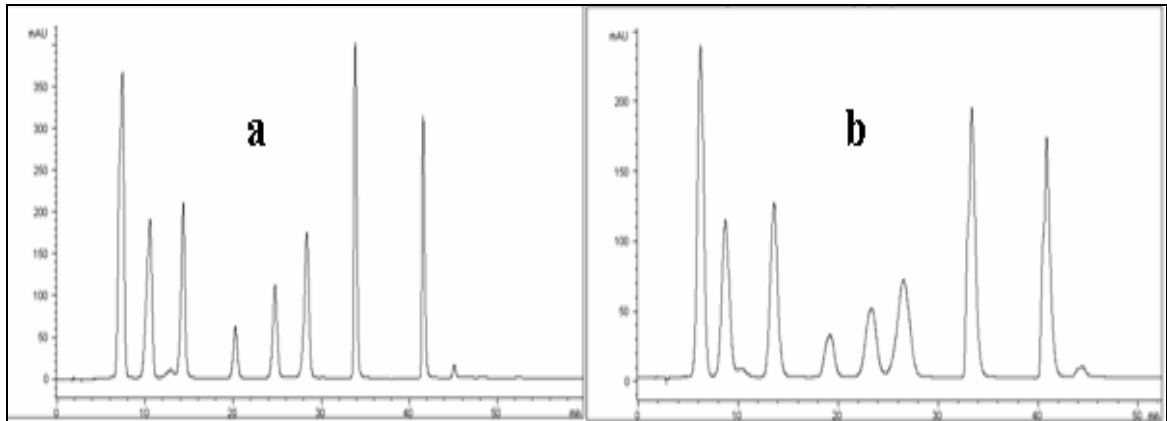
Con las condiciones cromatográficas usadas se logró buena separación de los compuestos de interés (Anexos 3 y 4). Con tal separación se logrará evitar interferencias con otros compuestos adicionales a los estándares como Df 3 gluc, Pt 3 gluc, Mv 3 gluc y petunidina, estándares con los que no se disponían y que se han encontrado en frijoles. No obstante, dichos compuestos han sido reportados mayormente en frijoles negros (Choung et al., 2004).

Se consideró los posibles daños que se pudieran ocasionar a la columna por la alta acidez y temperatura usada (0.1% de TFA y 35°C). No obstante, la Zorbax SB-C18, según especificaciones del distribuidor Agilent<sup>®</sup>, está recubierta por diisobutyl n-octadecylsilane, compuesto que califica a la columna para trabajar con muestras básicas, neutra y ácida. Se mantiene estable incluso con fase móviles muy agresivas (pH<2, por ejemplo) y temperaturas de 90°C.

Se observó que aparte del gradiente y la columna los factores que influenciaron más en la separación y resolución de los picos fueron la temperatura y el pH.

Al subir la temperatura de 20-35°C se logró bajar el tiempo total del cromatograma aproximadamente 5 min.

A mayor acidez mayor fue la resolución y separación de los picos de antocianinas y se observó mayor área debajo de la curva (Anexo 6). Dichas observaciones coinciden con (Wulf y Nagel 1978), quienes proponen el uso de un pH=1.5 para conseguir buena resolución de los picos. Según dichos autores, a mayor el pH (2-4) los picos se vuelven más anchos debido a la interferencia de antocianinas en otras formas del catión flavilio.

**Anexo 6.** Comparación en resolución por efecto de acidez.

**a** = Fase móvil acidificada con 0.3% de TFA.

**b** = Fase móvil acidificada con 0.1% de TFA.

**Anexo 7.** Datos medios de tres repeticiones para desarrollar modelos lineales en el método cromatográfico de antocianinas.

<b>Cy 3,5 digluc</b>				<b>Pg 3,5 digluc</b>			
ppm	Área	DE	%CV	ppm	Área	DE	%CV
500	17,784	132.2	0.7	500	17,085	167.2	1.0
250	9,022	61.5	0.7	250	8,303	56.9	0.7
125	4,095	42.7	1.0	125	4,025	36.6	0.9
50	1,703	9.1	0.5	50	1,674	30.3	1.8
25	525	11.3	2.1	25	817	6.7	0.8
1	55	1.5	2.7	1	33	0.9	2.5

<b>Cy 3 gluc</b>				<b>Pg 3 gluc</b>			
ppm	Área	DE	%CV	ppm	Área	DE	%CV
500	19,322	109.1	0.6	400	11,144	102.0	0.9
250	9,462	85.7	0.9	200	5,732	52.5	0.9
100	3,418	32.8	1.0	130	3,633	20.4	0.6
50	2,118	3.2	0.2	100	2,750	20.4	0.7
10	505	1.6	0.3	40	1,079	12.4	1.1
1	54	1.4	2.6	25	657	6.1	0.9
				5	162	1.2	0.7

<b>Mv 3 gluc</b>				<b>Pn 3 gluc</b>			
ppm	Área	DE	%CV	ppm	Área	DE	%CV
500	17933	163.6	0.9	500	23657	88.4	0.4
250	8933	77.2	0.9	250	11581	64.7	0.6
100	3513	11.0	0.3	100	4986	41.7	0.8
50	1885	36.2	1.9	50	2362	26.6	1.1
10	499	3.0	0.6	10	490	5.7	1.2
1	64	0.9	1.4	1	50	1.4	2.7

<b>Cianidina</b>				<b>Pelargonidina</b>			
ppm	Área	DE	%CV	ppm	Área	DE	%CV
500	35,842	161.9	0.4	175.00	12,488	78.1	0.6
200	13,582	157.8	1.1	50.00	3,315	11.1	0.3
50	3,460	25.5	0.7	10.00	736	1.4	0.1
10	781	3.2	0.4	1.00	71	0.5	0.8
1	73	0.6	0.9				

<b>Peonidina</b>			
<b>ppm</b>	<b>Área</b>	<b>DE</b>	<b>%CV</b>
500	24,729	161.7	0.6
250	11,666	198.2	1.7
100	4,787	18.4	0.3
50	2,346	10.3	0.4
10	474	4.2	0.9
1	50	1.3	2.7

**Anexo 8.** Datos medios de tres repeticiones para desarrollar modelo lineales en el método cromatográfico de antocianidinas.

<b>Malvidina</b>			
<b>ppm</b>	<b>Área</b>	<b>DE</b>	<b>%CV</b>
150	10,103	66.2	0.7
75	4,982	31.1	0.6
30	2,134	22.2	1.0
15	1,053	6.4	0.6
5	335	1.5	0.5

<b>Peonidina</b>			
<b>ppm</b>	<b>Área</b>	<b>DE</b>	<b>%CV</b>
300	14351	120	0.8
150	7036	651	0.9
75	3517	13	0.3
37.5	1769	20	1.1
3.75	121	1	0.8

<b>Pelargonidina</b>			
<b>ppm</b>	<b>Área</b>	<b>DE</b>	<b>%CV</b>
420	28,350	129	0.5
84	5,738	26	0.5
42	2,344	5	0.2
8	515	1	0.2

<b>Cianidina</b>			
<b>ppm</b>	<b>Área</b>	<b>DE</b>	<b>%CV</b>
450	29417	396	1.3
90	5847	54	0.9
45	2631	29	1.1
9	521	1	0.3

<b>Delfinidina</b>			
<b>ppm</b>	<b>Área</b>	<b>DE</b>	<b>%CV</b>
150.00	7,827	46.98	0.60
75.00	3,857	54.13	1.40
30.00	1,640	38.57	2.35
15.00	661	3.43	0.52
3.00	151	0.32	0.21

**Anexo 9.** Datos de concentraciones conocidas de antocianinas para validar los modelos lineales de predicción de antocianinas.

<b>Cianidina 3,5 diglucósido</b>			<b>Pelargonidina 3,5 diglucósido</b>		
<b>Esperado</b>	<b>Área</b>	<b>Obtenido</b>	<b>Esperado</b>	<b>Área</b>	<b>Obtenido</b>
500	18,031	521	500	17690	521
250	8,649	252	250	8930	264
250	9,145	266	125	3953	119
125	3,785	112	50	1712	53
50	1,657	51	50	1562	49
25	767	26	25	714	24

<b>Cianidina 3 diglucósido</b>			<b>Pelargonidina 3 diglucósido</b>		
<b>Esperado</b>	<b>Área</b>	<b>Obtenido</b>	<b>Esperado</b>	<b>Área</b>	<b>Obtenido</b>
500	19370	504	400	11058	395
500	18467	481	200	5808	208
250	9354	244	200	5630	201
100	3409	89	130	3618	129
50	2139	56	130	3579	128
50	2061	54	100	2715	97
10	510	14	100	2742	98
			25	1057	38

<b>Peonidina 3 glucósido</b>			<b>Peonidina</b>		
<b>Esperado</b>	<b>Área</b>	<b>Obtenido</b>	<b>Esperado</b>	<b>Área</b>	<b>Obtenido</b>
250	11507	244	500	24871	508
250	12069	256	500	23356	477
250	11684	247	250	12067	248
100	6022	127	250	11768	242
100	4994	105	100	5015	104
50	2284	48	50	2350	50
50	2118	44	50	2370	50
50	2373	50	50	2359	50
10	488	10	10	479	12

<b>Cianidina</b>			<b>Pelargonidina</b>			<b>Mv 3 glucósido</b>		
<b>Esp</b>	<b>Área</b>	<b>Obt</b>	<b>Esp</b>	<b>Área</b>	<b>Obt</b>	<b>Esp</b>	<b>Área</b>	<b>Obt</b>
500	35749	493	500	33344	496	500	17959	501
200	13203	181	175	11818	175	250	8407	234
50	3384	45	50	3304	47	50	1921	52
50	3525	47	50	3375	48	50	1896	52
10	813	9	50	3166	45	10	520	13
10	820	10						

**Anexo 10.** Datos con concentraciones conocidas de agliconas para validar los modelos lineales de predicción de agliconas.

<b>Delfinidina</b>			<b>Cianidina</b>		
<b>Esp</b>	<b>Área</b>	<b>Obt</b>	<b>Esp</b>	<b>Área</b>	<b>Obt</b>
30	1674	32	100	6071	95
30	1685	33	100	6132	95
15	700	14	45	2630	42
15	670	13	45	2597	42
3	149	3	10	544	10
3	153	3	10	547	10

<b>Pelargonidina</b>			<b>Peonidina</b>		
<b>Esp</b>	<b>Área</b>	<b>Obt</b>	<b>Esp</b>	<b>Área</b>	<b>Obt</b>
84	5811	88	150	7048	148
84	5576	84	150	7500	158
42	2304	36	75	3577	76
8	509	10	75	3402	72
8	504	10	38	1754	38
			38	1709	37

<b>Malvidina</b>		
<b>Esp</b>	<b>Área</b>	<b>Obt</b>
<b>150</b>	10409	155
<b>75</b>	4863	72
<b>75</b>	5014	74
<b>35</b>	2160	32
<b>18</b>	1025	15

**Anexo 11.** Cálculos para pasar de ppm a (mg de antocianinas/100 g de testa).

**Datos para el cálculo:**

ppm = mg/kg

mg/kg\* kg/L\*L/1000 ml= **mg/1000 ml**

Factor de dilución:

- 5 ml del extracto final
- Cantidad de testa = 0.5 g

**Fórmula general para el cálculo:**

$(\text{mg}/1000 \text{ ml}) * (5 \text{ ml}) / (0.5 \text{ g}) = \text{mg de antocianinas/g de testa}$

$(\text{mg de antocianinas/g de testa}) * 100 = \text{mg de antocianinas}/100 \text{ g de testa}$

**Para expresar en mg de antocianinas/100 g de grano:**

Normalmente la testa representa de 7-10% del grano.

$(\text{mg antocianinas}/100 \text{ g testa}) * (\% \text{ de la testa del grano}) = \text{mg antocianinas}/100 \text{ g de grano}$

**La última ecuación sale de:**

$(\text{mg de antocianinas}/100 \text{ g testa}) * (\text{testa/grano}) = \text{mg de antocianinas}/100 \text{ g de grano}$