

**Actividad antioxidante del extracto de flor de
Clitoria ternatea contra la oxidación del
colesterol**

Adriana Sofia López Prado

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2015

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Actividad antioxidante del extracto de flor de *Clitoria ternatea* contra la oxidación del colesterol

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

Presentado por

Adriana Sofía López Prado

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2015

Actividad antioxidante del extracto de flor de *Clitoria ternatea* contra la oxidación del colesterol

Presentado por:

Adriana Sofia López Prado

Aprobado:

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria

Jorge Cardona, Ph.D.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Actividad antioxidante del extracto de flor de *Clitoria ternatea* contra la oxidación del colesterol

Adriana Sofia López Prado

Resumen: Los pétalos de la flor *Clitoria ternatea* contienen un alto número de polifenoles, tales como antocianinas glucosiladas de delphinidina y malvidina, kaempferol y ternatinas. Los polifenoles poseen propiedades antioxidantes que interfieren en la oxidación lipídica causada por radicales libres. El objetivo del estudio fue evaluar el contenido total de fenólicos, contenido total de antocianinas y la actividad antioxidante de *Clitoria ternatea* en la interacción de agua destilada, metanol y su combinación (50:50) como solventes, con tiempos de remojo de 0, 6, 12 y 24 h. En una segunda fase se evaluó el efecto del pH a dos, seis y 10 en agua destilada con la cuantificación de las mismas variables. En la tercera fase se determinó la capacidad de inhibición de los extractos de la flor contra la oxidación del colesterol en una emulsión. A las 6 h de reposo, el extracto en la combinación de solventes obtuvo el mayor contenido de antocianinas (63.9 µg/ml). El extracto en la combinación de solventes inhibió el 89.8% del 7-cetocolesterol. La extracción en agua destilada a pH 10 inhibió el 90.7%, ambos a las 48 h de efecto oxidativo por dihidrocloruro de 2, 2'-azobis (2- amidinopropano) o AAPH. El uso de la combinación de solventes en la flor *Clitoria ternatea* surge como una alternativa de antioxidante natural para la prevención de oxidación del colesterol en emulsiones alimenticias.

Palabras clave: Antocianinas, 7-cetocolesterol, polifenoles.

Abstract: Flower petals of *Clitoria ternatea* have a high content of polyphenolics, such as delphinidin and malvidin glucoside anthocyanins, kaempferol and ternatins. Polyphenolics possess antioxidant properties that interfere with lipid oxidation caused by free radicals. The objective of this study was to evaluate the total phenolic content, total anthocyanin content and antioxidant activity of *Clitoria ternatea* in the interaction of distilled water, methanol and its combination (50:50) as solvents, with 0, 6, 12 and 24 h of soaking time. In a second stage, pH effect at 2, 6 and 10 was evaluated in distilled water by means of the quantification of the same variables. In the third stage, the flower extracts' inhibition capacity against cholesterol oxidation in an emulsion was determined. At 6 h of soaking time, the extract in the combination of solvents obtained the highest anthocyanin content (63.9 µg/ml). The extract in the combination of solvents inhibited 89.8% of 7-ketocholesterol. The extraction in distilled water at pH 10 inhibited 90.7%, both at 48 h of 2, 2'-azobis (2- amidinopropane) dihydrochloride or AAPH oxidative effect. The mixture of solvents used in *Clitoria ternatea* provides a natural antioxidant alternative for its use in food emulsions.

Key words: Anthocyanins, 7-ketocholesterol, polyphenols.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros y Figuras	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4. CONCLUSIONES.....	18
5. RECOMENDACIONES.....	19
6. LITERATURA CITADA.....	20

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Descripción de tratamientos en extracción de antocianinas de <i>Clitoria ternatea</i> ..	4
2. Contenido total de fenólicos de la flor de <i>Clitoria ternatea</i> en base seca en tres solventes durante cuatro tiempos de reposo	9
3. Capacidad antioxidante de DPPH de la flor de <i>Clitoria ternatea</i> en base seca en tres solventes durante cuatro tiempos de reposo	10
4. Contenido total de antocianinas de la flor de <i>Clitoria ternatea</i> en tres solventes durante cuatro tiempos de reposo	11
5. Probabilidad de las fuentes de variación y del modelo de los análisis realizados en el proceso de extracción de compuestos antioxidantes de las flores de <i>Clitoria ternatea</i>	12
6. Análisis Folin-Ciocalteu, DPPH y contenido total de antocianinas del extracto de la flor de <i>Clitoria ternatea</i> en base seca en tres niveles de pH en agua destilada durante seis horas de reposo	14

Figuras	Página
1. Porcentaje de inhibición de 7-cetocolesterol por extractos antioxidantes de <i>Clitoria ternatea</i> en tres distintos solventes con seis horas de reposo	15
2. Porcentaje de inhibición de 7-cetocolesterol por extractos antioxidantes de <i>Clitoria ternatea</i> en agua destilada a tres niveles de pH con seis horas de reposo	16

1. INTRODUCCIÓN

Clitoria ternatea L (CT), mejor conocida como Campanita, es una herbácea trepadora que presenta flores de consumo humano colores púrpura y blanco. Esta leguminosa es miembro de la familia *Fabaceae*, presumiblemente originaria de Asia tropical y se ha esparcido hasta China, India, Suramérica y América Central (Gomez y Kalamani, 2003). Las flores de *C. ternatea* contienen altos niveles de antocianinas, compuestos pertenecientes al grupo de los flavonoides (Kungsuwan *et al.*, 2014). Las antocianinas son pigmentos solubles en agua que poseen propiedades antioxidantes, por lo que han mostrado actividades biológicas y farmacológicas, como la prevención de enfermedades cardiovasculares y neurológicas, cáncer, diabetes y otras (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Las propiedades antioxidantes están asociadas a la capacidad de donar hidrógenos o electrones a los radicales libres, o atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática (Zapata *et al.*, 2004). Se ha descubierto la presencia de quercitina, kaempferol, malvidina, petunidina, astragalina y nicotiflorina (Morris, 2009) en estas flores. Adicionalmente, se ha revelado que la propiedad antioxidante de un extracto acuoso de los pétalos de flor de CT proviene de la presencia de compuestos bioactivos como 3,5-glucósido de delfinidina, 3 β -glucósido de de delfinidina, 3 β -glucósido de malvidina, kaempferol, p-ácido cumárico y seis tipos de ternatinas A1, A2, B1, B2, D1 y D2 (Chayaratanasin *et al.*, 2015). Por consiguiente, estas flores son adecuadas para profundizar investigaciones acerca de su actividad antioxidante en posibles aplicaciones alimentarias, ya que incluso han sido consumidas frescas sin preocupación por su toxicidad (Kaisoon *et al.*, 2011).

La oxidación lipídica produce compuestos tóxicos no deseados y forma radicales libres, promoviendo el deterioro nutricional y sensorial de los alimentos (Berton-Carabin *et al.*, 2014). Los radicales libres sustraen un electrón de compuestos lipídicos susceptibles como los ácidos grasos poliinsaturados y el colesterol, para alcanzar su estabilidad electroquímica (Echavarría *et al.*, 2009). Generalmente, la iniciación del proceso oxidativo es poco predecible, por lo que el estudio del período de latencia de la oxidación es dificultoso y se ve acompañado por un incremento inesperado de la tasa de degradación (Betigeri *et al.*, 2005). El uso de dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2- amidinopropano) o AAPH, un iniciador de radicales en la región acuosa de una emulsión, simplifica el estudio de la estabilidad oxidativa del colesterol bajo condiciones de laboratorio (Yuan *et al.*, 2005). Un iniciador hidrofóbico requeriría de la adición de solubilizadores orgánicos en el modelo (Betigeri *et al.*, 2005).

La ingesta de los productos oxidativos del colesterol en los alimentos aumenta sus niveles en el plasma y células intestinales, lo que promueve el riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares y cáncer (Xu *et al.*, 2005). Mas aún, se ha reportado el mecanismo de oxidación del colesterol similar al de los ácidos grasos, ya que ambos sufren reacciones de

cadena de radicales libres formando peróxidos y demás compuestos degradativos (Zhang, 2005). Estos productos oxidativos del colesterol en los alimentos son generados por la exposición a la luz, oxígeno o altas temperaturas (Xu *et al.*, 2005). Uno de los principales productos de la oxidación del colesterol es el 7-cetocolesterol (7-C), reportado de entre el 30-70% del total de sus productos oxidativos (Rodríguez *et al.*, 2014). El 7-C proviene de la reacción de cadena de radicales libres del colesterol, por medio de la deshidratación del 7-hidroxiperoxicolesterol (7-OOH) o de la deshidrogración del 7-hidroxicolesterol (7-OH) (Xu *et al.*, 2001). En casos extremos de esta vía de degradación, el colesterol incluso podría llegar a descomponerse en otros productos como hidrocarburos de cadena corta, aldehídos, cetonas o alcoholes (Zhang, 2005). Siendo el 7-cetocolesterol producido en grandes cantidades, facilita su cuantificación para definir el curso del proceso oxidativo del colesterol (Penazzi *et al.*, 1995).

Conjuntamente, los antioxidantes actúan como quelantes de iones metálicos catalíticos, eliminación de radicales libres e interfieren en la descomposición de peróxidos durante la oxidación lipídica (Rabeta y An Nabil, 2013). Actualmente, se busca atender la demanda de productos formulados con emulsiones que contengan menos aditivos, entre ellos, antioxidantes sintéticos (Berton-Carabin *et al.*, 2014). Generalmente, los antioxidantes naturales provenientes de plantas y especias son menos efectivas o potentes que las artificiales en las matrices alimentarias, por lo que la industria alimentaria se enfoca en el uso de antioxidantes sintéticos que interrumpen la cadena de radicales libres durante la oxidación lipídica. Por ejemplo, galatos de alquilo, BHA (hidroxianisol butilado) y BHT (hidroxitolueno butilado) se han utilizado para este fin aprobados en Estados Unidos y Europa, a pesar que podrían ser carcinogénicos. Por otro lado, TBHQ (*ter*-butilhidroxiquinona) no está autorizada en los países europeos y el NDGA (ácido nordihidroguayarático) ha dejado de reconocerse como Generalmente Segura (GRAS, por sus siglas en inglés) (Nollet, 2004). Consecuentemente, el uso de antioxidantes naturales en alimentos se ve limitado por la poca información disponible acerca de su composición molecular, su contenido de compuestos bioactivos y su posible toxicidad (Rahman, 2007). Además, el número de antioxidantes disponibles para la industria de alimentos para prevenir rancidez oxidativa es muy limitada, así como la aprobación de nuevos antioxidantes suele ser un proceso muy costoso, por lo que la búsqueda de antioxidantes naturales es un reto científico (Laguerre *et al.*, 2015).

Los objetivos de este estudio fueron:

- Evaluar cuatro tiempos de reposo, dos solventes y la combinación que mejor exprese la capacidad antioxidante de la flor Campanita al tiempo más eficientemente económico.
- Evaluar la actividad antioxidante de la flor Campanita en agua destilada a tres niveles de pH.
- Detectar el efecto antioxidante de las seis extracciones de la flor Campanita en un modelo de emulsión de colesterol a través de la cuantificación del producto oxidativo 7-cetocolesterol

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. Este estudio fue realizado en el Departamento de Ciencias de los Alimentos en la Universidad Estatal de Louisiana, Estados Unidos.

Materiales. Se utilizaron flores secas de *Clitoria ternatea* (provenientes de Tailandia) donadas por Witoon Prinyawiwatkul, docente del Departamento de Ciencia de los Alimentos de la Universidad Estatal de Louisiana (Baton Rouge, LA, USA). Los solventes utilizados para la extracción fueron agua destilada y metanol $\geq 95\%$. Para las evaluaciones antioxidantes, se utilizó un radical libre comercial DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), Trolox, reactivo de Folin-Ciocalteu, carbonato de sodio (Na_2CO_3) y ácido gálico a 100 ppm (Sigma-Aldrich, USA). Ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH) se utilizaron para el análisis a distintos pH. Para la cuantificación de antocianinas en HPLC, se utilizó acetonitrilo y ácido acético. Para la emulsión, se utilizó un estándar de colesterol en polvo, dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) como acelerador de oxidación, Tween 20 como emulsificador y hexano $\geq 95\%$ grado de HPLC (Sigma-Aldrich, USA).

Extracción de antocianinas de *Clitoria ternatea*. Se removieron los sépalos y el pedúnculo de cada flor previamente secada y los pétalos fueron cortados con un molino para granos eléctrico (Mr. Coffee IDS77). Se preparó 0.2 g de CT en 4 ml de solvente. Los solventes experimentados fueron agua destilada, metanol y una mezcla de ambos a una proporción de 50:50. Los tubos se agitaron en un vortex durante dos a tres segundos para asegurar el contacto entre la muestra de flor y el solvente. Las muestras permanecieron en un tiempo de reposo de 0, 6, 12 o 24 horas (cuadro 1). Posterior a los tiempos especificados, las muestras fueron sumergidas en baño maría a 60 °C durante 20 min y centrifugadas a 4000 rpm durante 20 min. El extracto sobrenadante se colectó sin residuos de flor en un tubo separado (Kamkaen y Wilkinson, 2009). Cada extracto se mantuvo a 4 °C hasta su uso, exceptuando las muestras en metanol, mantenidas a -20 °C. Todos los tratamientos se realizaron en triplicados.

Cuadro 1. Descripción de tratamientos en extracción de antocianinas de *Clitoria ternatea*.

Tratamiento	Solvente	Tiempo de reposo (h)
AD0	Agua destilada	0
AD6		6
AD12		12
AD24		24
M0	Metanol	0
M6		6
M12		12
M24		24
ADM0	Agua destilada:Metanol	0
ADM6	(50:50)	6
ADM12		12
ADM24		24

Determinación del contenido total de fenólicos (CTF) por el método Folin-Ciocalteu (FC). Se mezcló 0.75 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu (previamente diluido 10 veces con agua destilada) con 0.1 ml de cada uno de los tratamientos de extracto de CT en cubetas de espectrofotometría, encerradas en un estuche de aluminio durante un tiempo de reacción en la oscuridad de cinco minutos a 25 °C. Posteriormente, se añadió 0.75 ml de carbonato de sodio Na₂CO₃ (60 g/L) durante un tiempo de reacción 90 min a 25 °C en la oscuridad. Se registró la absorbancia de cada tratamiento a 750 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS Lambda 20) (Kaisoon *et al.*, 2011). Todos los tratamientos se realizaron en triplicados. El estándar de compuesto fenólico comúnmente usado es el ácido gálico. Los resultados se expresaron en miligramos de equivalente de ácido gálico (GAE) por gramo de flor de CT en base seca (Charles, 2013). Se graficó una curva estándar a diferentes concentraciones de ácido gálico (0, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 ppm) con sus respectivas lecturas de absorbancia. Se calculó el equivalente de ácido gálico con la ecuación lineal 1 obtenida de la curva estándar ($R^2 = 0.9986$):

$$y = 0.007x + 0.0727 \quad [1]$$

Donde:

y: absorbancia a 750 nm

x: concentración de equivalente de ácido gálico (mg/g)

Determinación de actividad antioxidante con análisis DPPH. La capacidad antioxidante se monitoreó por medio del ensayo DPPH, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, en un espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS Lambda 20) mediante el descenso en la absorbancia a 517 nm (Charles, 2013). Se mezcló 1.8 ml de una solución de DPPH a una concentración de 0.1mM (39.432 mg/100 ml) diluido 10 veces con metanol, con 0.2 ml del extracto de CT. Cada tratamiento se colocó en cubetas de espectrofotometría, encerradas en un estuche de aluminio durante un tiempo de reacción en la oscuridad de 30 min a 25 °C (Molyneux, 2004). Todos los tratamientos se realizaron en triplicados. La absorbancia se

monitoreó a cero min (A_0) y a los 30 min transcurridos (A_{30}). El porcentaje de inhibición o de capacidad antioxidante se calculó según la ecuación 2 (Shen, 2013):

$$(\%) = \left[\frac{(A_0 - A_{30})}{A_0} \right] \times 100 \quad [2]$$

Los resultados de la actividad antioxidante se expresaron en milimoles (mM) de equivalente de Trolox (TE, Vitamina E hidrosoluble) por gramo de flor de CT en base seca (Moon y Shibamoto, 2009). Se graficó una curva estándar a diferentes concentraciones de Trolox (0, 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5 y 1.0 mM) con sus respectivos porcentajes de inhibición. Se calculó el equivalente de Trolox con la ecuación lineal 3 obtenida de la curva estándar ($R^2 = 0.9921$):

$$y = 182.62x + 2.2635 \quad [3]$$

Donde:

y: porcentaje de inhibición (%)

x: concentración de equivalente de Trolox (mM/g)

Determinación del contenido total de antocianinas (CTA) en HPLC. Se determinó el contenido total de antocianinas de cada extracto a través de un análisis cromatográfico en un HPLC Waters™ 2690 modelo de separación, equipado con un detector de matriz de fotodiodos (DAD, “diode-array detector”) Waters™ 996. En la cromatografía de fase reversa, se utilizó una fase móvil polar A (Acetonitrilo), una fase móvil B (10% de ácido acético en agua destilada), y una columna de fase estacionaria no polar C18 (Luna® 5 μ m C18(2) 100 Å) de tamaño 250 x 4.6 mm. La longitud de onda de detección fue de 300-500 nm y la velocidad de flujo de 1 ml/min. Se estableció un sistema de gradiente de: 0 min, 100% B; 40 min, 24% A y 76% B; 41 min, 100% B; 45 min, 100% B. El volumen de inyección utilizado de cada tratamiento fue de 20 μ L, cada uno analizado durante 45 min. Se sumó el área total de antocianinas en el cromatograma de cada repetición y se convirtió en microgramos de antocianinas por mililitro de extracto de CT basado en la ecuación lineal 4 obtenida de la curva estándar de cloruro de cianidina (Zhang *et al.*, 2013):

$$y = 2 \times 10^6 x \quad [4]$$

Donde:

y: área total de picos

x: concentración de antocianinas (μ g/20 μ l de extracto)

Efecto del pH en la hidrólisis de antocianinas de *Clitoria ternatea*. El proceso de extracción anterior se repitió. En este caso, se experimentó la extracción o hidrólisis de antocianinas en agua destilada cercana a la neutralidad (pH 6), acidez (pH 2) con ácido clorhídrico y alcalinidad (pH 10) con hidróxido de sodio, medido con tiras indicadoras de pH. El tiempo de reposo que mayor expresó las características antioxidantes de CT identificado con el análisis DPPH se aplicó al medir el efecto del pH durante la extracción. Los extractos se secaron en una centrifuga al vacío (Labconco® Acid-Resistant CentriVap

Centrifugal Vacuum Concentrator) a 60 °C durante tres horas. De igual manera, a cada tratamiento se evaluó el contenido total de fenólicos por gramo de extracto de CT en base seca, la actividad antioxidante con DPPH y el contenido total de antocianinas. Todos los tratamientos se realizaron en triplicados.

Modelo de emulsión de colesterol. Se preparó 400 ml de emulsión añadiendo 0.1% del estándar de colesterol en polvo (0.4 g), 0.1% de Tween 20 como emulsificador (0.4 g), 200 mg de AAPH como iniciador de radicales libres y el contenido restante fue agua destilada. Para asegurar una emulsión homogénea, la mezcla fue sonicada (Branson B1510MT) durante dos horas y se revolvió durante una hora en un agitador magnético. Los extractos secos obtenidos con los tres solventes y los tres niveles de pH al mejor tiempo de remojo se redisolviaron en agua destilada hasta una concentración de 6 mg de antocianinas/ml. En frascos de 40 ml con tapa de sello Teflon, se añadió 19 ml de emulsión y 1 ml de cada respectivo extracto como agente antioxidante. El blanco no contuvo extracto de antocianinas, más 1 ml de agua destilada fue añadido para mantener volúmenes equitativos entre tratamientos (20 ml). Todos los tratamientos se realizaron el triplicados, incluyendo los blancos. Los frascos se incubaron en baño maría a 37 °C en agitación magnética constante (Magnetic Multistirrer Velp Company) a 890 rpm durante dos días (Zhang *et al.*, 2013).

Extracción y determinación de 7-cetocolesterol (7-C). Se recuperó 2 ml de emulsión de cada frasco a las 24 h y 48 h. Se combinó con 2 ml de hexano, se agitó por 1 min, fue sonicada durante 15 min y centrifugada por 15 min a 4000 rpm para separar la capa acuosa de la de hexano. La capa superior de hexano fue colectado y transferido a un tubo separado para evaporar el solvente en una centrífuga al vacío durante 15-20 min. El compuesto en cada tubo fue redisoluelto en 1 ml de hexano y transferido a un frasco de HPLC para analizar el producto oxidativo del colesterol, 7-cetocolesterol. Se analizó en un HPLC Agilent 1100 con una fase móvil de alcohol isopropílico al 3% en hexano a una velocidad de flujo de 1.5 ml, una columna de fase normal de tamaño 250 x 4.6 mm (5 µm) y un detector UV (ultra-violeta) a 234 nm (Tian *et al.*, 2011). El volumen de inyección utilizado de cada tratamiento fue de 100 µl, cada uno analizado durante 20 min. La concentración en cada tratamiento fue calculado usando una curva de calibración del estándar de 7-cetocolesterol. El porcentaje de inhibición del extracto como antioxidante se calculó relacionando la concentración de 7-cetocolesterol del blanco (C_b) y la concentración del mismo en cada tratamiento (C_t), según la ecuación 5 (Shen, 2013):

$$(\%) = \left[\frac{(C_b - C_t)}{C_b} \right] \times 100 \quad [5]$$

Análisis estadístico. Se usó un diseño completamente al azar (DCA) y se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para la extracción de antocianinas de *C. ternatea* con un arreglo factorial de cuatro tiempos de reposo por tres tipos de solvente y su interacción con tres repeticiones. La separación de medias de los análisis de DPPH, CTF y CTA en los extractos obtenidos con y sin el efecto de tres niveles de pH o hidrólisis de antocianinas en la extracción, se utilizó la prueba de Tukey a un $\alpha = 0.05$ para determinar las diferencias estadísticas. El programa de análisis estadístico SAS 2003® se utilizó en el análisis de los

datos. Para el modelo de emulsión, se aplicó un diseño de bloques completos al azar (BCA) en el análisis del extracto de *C. ternatea* en tres solventes y tres niveles de pH, y su interacción en el tiempo con mediciones a las 24 y 48 horas. Igualmente, las diferencias significativas fueron medidas con la prueba Tukey a un $\alpha = 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido total de fenólicos de *C. ternatea*. El análisis de Folin-Ciocalteu se basa en un mecanismo de transferencia de un electrón (“Single Electron Transfer”, SET). Este mecanismo estima el contenido total de compuestos fenólicos cuando ocurre un cambio de color de amarillo a azul oscuro identificado a 750 nm, causado por una solución antioxidante (Charles, 2013), en este caso el extracto de CT. El extracto en AD tuvo el mismo CTF hasta las 12 h de reposo, disminuyendo a las 24 h. En el caso de la extracción con metanol, el CTF aumentó significativamente hasta las 24 h, por lo que un período tan largo de reposo no es factible para la aplicación en la industria alimentaria. El interés de ella es una extracción que permita mayor productividad en el menor tiempo consumido (Azuola y Vargas, 2007). El extracto en la mezcla de solventes ADM sufrió un descenso del CTF a las 6 h, aumentando nuevamente a las 12 y 24 h de reposo, tiempo en el cual expresó el mismo CTF que a las 0 h de reposo (cuadro 2). Estos resultados siguieron el principio de la relación estructura-actividad, en donde la intensidad de la actividad de los compuestos fenólicos con el reactivo FC es proporcional a la disponibilidad de los grupos hidroxilo en los anillos aromáticos de los mismos. También, podría ser influenciado por otros grupos químicos que incrementan o disminuyen el potencial reductor de los compuestos en el extracto, probablemente realizando un efecto estérico por interacción electrónica (Blainski *et al.*, 2013). Es decir, sustratos voluminosos, por ejemplo grupos alquilo, unidos a los nucleófilos o compuestos polifenólicos pueden retrasar el estado de transición de la reacción química entre éste y el reactivo de FC, dándose un impedimento estérico (Cabildo *et al.*, 2011).

Como se observa en el cuadro 2, el tratamiento en AD6 fue más alto (13.5 mg GAE/g) que el tratamiento M6 (5.89 mg GAE/g) y ADM6 (11.7 mg GAE/g). Los compuestos fenólicos son antioxidantes naturales solubles en agua, ya que contienen un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo (Rabeta y An Nabil, 2013), hecho que podría justificar esta fluctuación. Los polifenoles en las plantas se pueden encontrar tanto libres en el medio líquido de la célula vegetal como ligados a las fibras de la pared celular vegetal (Xu y Howard, 2012). Se ha observado que la extracción en metanol aumenta la solubilidad de los polifenoles al facilitar la penetración a la estructura celular (Rabeta y An Nabil, 2013). Sin embargo, ya que el análisis se realizó en las flores de CT y no en hojas u otra parte vegetativa, se ha encontrado un mayor CTF en extractos en agua destilada que en metanol en esta parte de la planta de CT (Rabeta y An Nabil, 2013). Por consiguiente, se estimó que en las flores de CT se encuentran más polifenoles con afinidad por el agua. Se esperó que los tratamientos en ADM combinarían las características de ambos solventes, mas no presentó diferencias significativas con los tratamientos en AD a las 0 y 12 h de reposo (cuadro 2).

Cuadro 2. Contenido total de fenólicos de la flor de *Clitoria ternatea* en base seca en tres solventes durante cuatro tiempos de reposo.

Solvente	Tiempo de reposo (h)			
	0	6	12	24
Agua destilada	13.8 ± 0.5 ^{A (a, b)}	13.5 ± 1.0 ^{A (a, b)}	13.9 ± 0.0 ^{A (a)}	12.2 ± 2.1 ^{B (b)}
Metanol	5.72 ± 0.7 ^{B (b) €}	5.89 ± 0.2 ^{C (b)}	7.36 ± 0.4 ^{B (b)}	13.7 ± 1.8 ^{B (a)}
Agua destilada:				
Metanol(50:50)	14.1 ± 0.6 ^{A (a, b)}	11.7 ± 0.7 ^{B (c)}	12.6 ± 0.3 ^{A (b, c)}	14.5 ± 1.4 ^{A (a)}
CV (%)	5.2	5.1	2.5	15.9

^{ABC} Las medias con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas en la misma columna (P<0.05).

^{abc} Las medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas en la misma fila (P<0.05).

[€] Miligramos de equivalente de ácido gálico por gramo de flor en base seca (mg GAE/g).

[£] Coeficiente de variación.

Alterar los factores físicos manipulados en el proceso de extracción podría manifestar mayores rendimientos. Por ejemplo, se ha reportado un CTF de 20.7 mg GAE/g de flor de CT en base seca obtenido con un tiempo de reposo de una hora con agitación ocasional en agua destilada (Rabeta y An Nabil, 2013). Este resultado es mayor al que se consiguió con un tiempo de reposo de 24 h con una sola agitación inicial (cuadro 2). Por otro lado, el estudio ejemplificado utilizó una menor proporción de flor-solvente (0.02 g/ml) (Rabeta y An Nabil, 2013) que el aplicado en la presente investigación (0.05 g/ml). Por consiguiente, realizar una agitación mecánica o vortex con mayor frecuencia y utilizar un mayor volumen de solvente podría incrementar el rendimiento de extracción y disminuir el tiempo de reposo necesario (Xu y Howard, 2012).

El análisis de Folin-Ciocalteu provee una estimación bruta del contenido total de fenólicos en los extractos (Alali *et al.*, 2007). Es decir, los resultados demostraron el contenido total de varios polifenoles de manera general, ya que muchos compuestos reaccionan de maneras distintas con el reactivo de FC por diferencias de unidad de masa o por cinética de la reacción (Blainski *et al.*, 2013).

Actividad antioxidante con análisis DPPH. Entre los tratamientos con agua destilada, AD6 tuvo la mayor capacidad antioxidante con 11.7 mM TE/g de extracto (cuadro 3), resultando ser estadísticamente igual al tratamiento ADM6 con 12.2 mM TE/g. Este mecanismo mide la capacidad de un antioxidante de secuestrar o inhibir radicales libres por medio del grado de disminución de la absorción UV a 517 nm. En este caso, los compuestos presentes en la flor de CT donaron una molécula de hidrógeno al radical de nitrógeno orgánico (DPPH), lo que causó un cambio de color de morado (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) a amarillo (2,2-difenil-1-picrilhidrazine) (Moon y Shibamoto, 2009).

Se observó que el CTF del tratamiento en AD (cuadro 2) tuvo una relación directa con su capacidad antioxidante (cuadro 3) (Alali *et al.*, 2007), ya que ambos parámetros se mantuvieron estables por 12 h, así como ambos tuvieron una reducción significativa a las 24 h. Esto comprueba que la capacidad antioxidante de *C. ternatea* es afectada por la cantidad total de polifenoles (Zingare *et al.*, 2013). No obstante, esta relación directa no se

observó en el tratamiento ADM6, donde su capacidad antioxidante no se redujo a las 6 h (cuadro 3) cuando el CTF sí lo hizo (cuadro 2). Posiblemente, este comportamiento sería atribuible a la presencia de compuestos no-fenólicos sin descubrir que poseen una mayor actividad antioxidante. Esto se ha observado en ciertas plantas donde se les ha asociado una actividad antioxidante alta con un contenido bajo de fenólicos (Alali *et al.*, 2007). Contrariamente, se notó un mayor CTF a las 24 h de reposo (cuadro 2) en el extracto en metanol, pero una reducción de la capacidad antioxidante (cuadro 3).

Por otro lado, a diferencia del extracto en AD, el extracto en ADM no presentó diferencias estadísticas significativas de su actividad antioxidante entre los cuatro tiempos de reposo. Esta estabilidad a través del tiempo sirvió como parámetro para tomar ADM6 como el que mejor expresó la actividad antioxidante de los pétalos de CT en el menor tiempo de extracción. A pesar que el tratamiento ADM0 fue estadísticamente igual al ADM6, no se tomó en consideración, ya que el tiempo de reposo encontrado en la literatura es muy variable, desde una hora hasta más de 12 horas, dependiendo de las características de la muestra a evaluar (Xu y Howard, 2012).

Cuadro 3. Capacidad antioxidante de DPPH de la flor de *Clitoria ternatea* en base seca en tres solventes durante cuatro tiempos de reposo.

Solvente	Tiempo de reposo (h)			
	0	6	12	24
Agua destilada	10.9 ± 0.4 ^{A (a, b)}	11.7 ± 0.4 ^{A (a)}	11.1 ± 0.4 ^{A (a, b)}	9.45 ± 2.1 ^{B (b)}
Metanol	6.36 ± 0.3 ^{B (c) €}	6.99 ± 0.5 ^{B (c)}	11.7 ± 1.3 ^{A (a)}	8.81 ± 0.6 ^{B (b)}
Agua destilada:				
Metanol(50:50)	11.4 ± 0.7 ^{A (a)}	12.2 ± 1.0 ^{A (a)}	11.2 ± 0.6 ^{A (a)}	11.3 ± 1.1 ^{A (a)}
CV (%)	3.0	7.9	9.5	12.5

^{ABC} Las medias con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas en la misma columna (P<0.05).

^{abc} Las medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas en la misma fila (P<0.05).

[€] Milimoles de equivalente de trolox por gramo de flor en base seca (mM TE/g).

[‡] Coeficiente de variación.

Contenido total de antocianinas en HPLC. Nuevamente, se observó una relación directa en el incremento del CTF (cuadro 2) y CTA (cuadro 4) hasta las 24 h en el tratamiento con metanol. A pesar que el tratamiento M24 demostró el CTA más alto (94.1 µg/ml), el proceso de extracción de 24 horas no es económicamente viable para la industria alimentaria, como mencionado anteriormente.

Los tratamientos en AD y ADM mantuvieron la particularidad de consistencia incluso en su CTA. Es decir, el tratamiento en AD tuvo una reducción significativa de CTA hasta las 24 h, mientras que el obtenido en ADM se mantuvo constante en los cuatro tiempos de reposo. Esto puede deberse a que las antocianinas en su forma aglicona son inestables en soluciones neutras, aunque esta característica es superada con modificaciones glicosiladas o asiladas (Tanaka *et al.*, 2011). Por consiguiente, se estimó que el solvente ADM extrajo antocianinas con estas modificaciones por la distinta polaridad atribuida a la mezcla de

solventes (Xu y Howard, 2012). Se ha visto también el uso de la mezcla de solvente de agua destilada y metanol para un mayor rendimiento de extracción de antocianinas (Zhang *et al.*, 2004).

La inestabilidad observada en AD24 pudo estar ligada a la ausencia de esta combinación de polaridad. Por otro lado, los compuestos pudieron haberse oxidado en un tiempo de remojo muy largo, disminuyendo así el rendimiento de CTF, CTA y su actividad antioxidante a las 24 h (Dai y Mumper, 2010). Adicionalmente, en un estudio se encontró un alto rendimiento de antocianinas en un periodo de reposo de aproximadamente cuatro horas, y con un tiempo menor a dos horas, la extracción de antocianinas no fue significativa (Zapata *et al.*, 2004). Por consiguiente, se eligió ADM6 como el extracto con mayor CTA (63.9 µg/ml) con el menor tiempo de reposo. Es de notar que no existe un proceso universal para extraer todos los polifenoles de una planta (Dai y Mumper, 2010), pero se pudo encontrar el que más se ajustó a la flor de CT.

Cuadro 4. Contenido total de antocianinas de la flor de *Clitoria ternatea* en tres solventes durante cuatro tiempos de reposo.

Solvente	Tiempo de reposo (h)			
	0	6	12	24
Agua destilada	58.2 ± 9.6 ^{A(a)€}	51.8 ± 6.9 ^{A, B(a, b)}	49.0 ± 5.6 ^{A(a, b)}	39.9 ± 11.5 ^{C(b)}
Metanol	49.3 ± 5.4 ^{A(b)}	51.2 ± 3.2 ^{B(b)}	52.1 ± 4.8 ^{A(b)}	94.1 ± 10.6 ^{A(a)}
Agua destilada:				
Metanol(50:50)	60.0 ± 4.2 ^{A(a)}	63.9 ± 6.1 ^{A(a)}	59.9 ± 2.7 ^{A(a)}	64.8 ± 8.26 ^{B(a)}
CV (%)	13.0	11.4	8.4	14.0

^{ABC} Las medias con diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas en la misma columna (P<0.05).

^{abc} Las medias con diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas en la misma fila (P<0.05).

[€] Microgramos de antocianinas por mililitro de flor solubilizada en base seca (µg CTA/ml).

[£] Coeficiente de variación.

Las antocianinas generalmente se encuentran en la sábila acuosa de la vacuola en la epidermis de células vegetales. Su estructura química consiste en un núcleo flavón, dos anillos aromáticos unidos por una unidad de tres carbonos, con distintos niveles de hidroxilación y metilación (antocianidinas) (Aguilera Ortíz *et al.*, 2011). Estos niveles afectan enormemente el espectro al cual son identificadas las antocianidinas (Zhang *et al.*, 2004). Las antocianinas son caracterizadas por las diferentes antocianidinas, el tipo, posición y número de azúcares ligados a la molécula (antocianinas glucosiladas) y ácidos aromáticos unidos a los azúcares en la molécula (antocianinas asiladas) (Lima *et al.*, 2011). De estas características depende el orden de elusión en la columna del HPLC (Socaciu, 2008). En general, más glicosilaciones o hidroxilaciones incrementan la movilidad de las antocianinas, mientras que las *O*-metilaciones y asilaciones incrementan el tiempo de elusión (Socaciu, 2008). Se presume que las antocianinas en los pétalos de CT contienen grupos cafeoil, cumaroil y/o sinapoil, ya que estos grupos de ácidos aromáticos confieren el color azul a las flores (Tanaka *et al.*, 2011). Debido a la alta variabilidad de antocianinas existentes, es irrazonable contar con un estándar para cada una (Xu y Howard, 2012).

Cloruro de cianindina fue el estándar utilizado y una longitud de onda de 350 nm permitió monitorear el contenido total de antocianinas. Antioxidantes a 325 nm, cercano a la longitud de onda utilizada, han sido encontrados en análisis HPLC con DAD (Schwarz *et al.*, 2001).

Estos últimos tres análisis mostraron una probabilidad del modelo ($P < 0.05$) que indicó que por lo menos un tratamiento dentro de cada análisis fue diferente (cuadro 5). Específicamente, el análisis Folin-Ciocalteu indicó que las variables del solvente y tiempo tuvieron una influencia significativa en los resultados. Mientras que, en los análisis de DPPH y cuantificación de antocianinas en HPLC, el tipo de solvente utilizado tuvo mayor influencia en los extractos que el tiempo de reposo.

Cuadro 5. Probabilidad de las fuentes de variación y del modelo de los análisis realizados en el proceso de extracción de compuestos antioxidantes de las flores de *Clitoria ternatea*.

Tipo de análisis	Efecto del solvente	Efecto del tiempo de reposo	Interacción	Modelo
Análisis de Folin-Ciocalteu	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Capacidad antioxidante con DPPH	<0.0001	0.0057	0.0001	<0.0001
Contenido total de antocianinas en HPLC	0.0006	0.0067	<0.0001	<0.0001

Efecto del pH en la hidrólisis de antocianinas de *C. ternatea*. El mayor contenido de antocianinas se extrajo a pH 2 (251.2 $\mu\text{g/ml}$ extracto), lo que evidencia que las antocianinas son más estables a condiciones altamente ácidas. De la misma manera, la mayor capacidad antioxidante fue en pH ácido (12.2 mM TE/g), como se reporta en el cuadro 6. Un estudio de la optimización de extracción de antocianinas en las flores de CT concluyó que la mayor actividad antioxidante según DPPH se encontraría a un pH < 3 y con un CTA mayor a 200 $\mu\text{g/ml}$ extracto (Kungsuwan *et al.*, 2014). La única diferencia es que dicha optimización se reportó en extractos de metanol acidificado, mientras que el presente estudio alcanzó la optimización de extracción en agua destilada acidificada.

El pH influyó en el color de los extractos de antocianinas de la flor de CT, así como lo encontrado en la literatura (Sinha *et al.*, 2012), y en las lecturas de absorbancia. A un pH bajo, predomina el catión flavilio junto con otras formas de antocianinas y se visualizó un color rojo. A medida que aumenta el pH, las antocianinas sufren una deprotonación, por lo que a un pH cercano a la neutralidad se forman bases quinoidales aniónicas (Santos-Buelga *et al.*, 2010). En valores de pH básicos, se da una transformación estructural, lo que intensificó el color azul y se redujo el contenido de antocianinas (Junka *et al.*, 2012). En este cambio estructural, más protones son despegados y la estabilidad se ve afectada por número de hidroxilos en los anillos fenólicos y por el tipo de grupos sustituyentes que presenten las antocianinas en las flores de CT (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). A pH 10 se redujo la capacidad antioxidante (8.6 mM TE/g) debido a esta deprotonación; es decir, hubieron menos iones hidrógeno para convertir el radical DPPH a su estado reducido de

2,2-difenil-1-picrilhidrazine, afectando la lectura de absorbancia UV y reduciendo la actividad antioxidante (Molyneux, 2004).

Sin embargo, el pH no afectó la lectura del CTF en los extractos, donde no hubo diferencias significativas. En efecto, tanto la acidez como la alcalinidad beneficiaron la liberación de compuestos fenólicos, ya que la alcalinidad permitió la liberación de aquellos vinculados a las fibras de la pared celular de la flor, algunos unidos a otros compuestos con enlaces éster, y que no están solubilizados en el medio acuoso de la célula (Xu y Howard, 2012). Por otro lado, anteriormente se vio que el CTF tuvo una relación directa con la actividad antioxidante sin hidrólisis de pH en agua destilada. En este caso de una hidrólisis a pH 10, la capacidad antioxidante se redujo aun cuando el CTF fue alto. Se ha reportado que la actividad antioxidante de un extracto de un híbrido de la flor *Vanda* se redujo cuando las antocianinas fueron menos purificados o más lejanos al pH ácido ideal (Junka *et al.*, 2012). Por otro lado, los extractos de la flor de *Vanda* a 4000 ppm exhibieron mayores porcentajes de actividad antioxidante a pH 2 que los obtenidos en los extractos de CT a 6000 ppm. Es decir, se podría llegar a un mayor rendimiento de extracto de antocianinas de CT si se aumenta la proporción de solvente utilizado.

Más aún, condiciones de pH extremas causó la degradación de antocianinas, donde el cromatograma del HPLC a 350 nm identificó un menor CTA a pH 10 con 171.5 µg/ml que a pH 6 con 230.6 µg/ml (cuadro 6). Este contenido a pH 10 podría indicar la presencia de las agliconas pelargonidina, peonidina y malvidina, ya que al poseer un grupo hidroxilo libre en el anillo B de su estructura química les da más estabilidad en ambientes básicos que las otras tres agliconas existentes. Así mismo, podrían haber antocianinas aciladas, las cuales son más resistentes a la hidratación del ión flavilio a pH básico (Welch *et al.*, 2008). Por otro lado, el hecho que el CTA a pH 6 se asemejó estadísticamente al del extracto a un pH 2 podría indicar que las flores de CT contienen antocianinas monoglicosiladas o diglicosiladas, ya que las moléculas de azúcar evitan la degradación a compuestos inestables como ácidos fenólicos o aldehídos, atribuyendo cierta estabilidad a pH neutro (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

Cuadro 6. Análisis Folin-Ciocalteu, DPPH y contenido total de antocianinas del extracto de la flor de *Clitoria ternatea* en base seca en tres niveles de pH en agua destilada durante seis horas de reposo.

Nivel de pH	Contenido Total de Fenólicos (mg GAE/g extracto) [¥]	Capacidad Antioxidante (mM TE/g extracto) ^Ω	Contenido Total de Antocianinas (µg/ml extracto)
2	43.2 ± 1.9 ^a [€]	121.8 ± 1.5 ^a	251.2 ± 21.5 ^a
6	42.3 ± 1.1 ^a	99.22 ± 3.0 ^b	230.6 ± 2.39 ^{a, b}
10	45.7 ± 3.0 ^a	86.15 ± 8.0 ^b	171.5 ± 0.29 ^b
CV (%) [£]	4.9	4.5	5.5
P > F ^δ	0.3423	0.0049	0.0573

[¥] Miligramos de equivalente de ácido gálico por gramo de extracto de la flor en base seca.

^Ω Milimoles de equivalente de trolox por gramo de extracto de la flor en base seca.

[€] Las medias con diferentes letras indican diferencias significativas (P<0.05).

[£] Coeficiente de variación.

^δ Probabilidad del modelo.

Evaluación antioxidante de *C. ternatea* contra 7-cetocolesterol. Se detectó el producto oxidativo 7-C en la emulsión sin extracto antioxidante a una concentración de 2.2 µg/ml a las 24 h y 6.8 µg/ml a las 48 h (figura 1), similar a lo encontrado en la literatura, 1.7 y 8.7 µg/ml respectivamente (Zhang *et al.*, 2013). Se presume que el área interfacial entre la fase lipídica y acuosa en la emulsión de colesterol es el área que promueve el contacto entre los lípidos y los compuestos prooxidantes (AAPH) disueltos en la fase acuosa. Por ende, esta es la región crítica donde la oxidación lipídica se lleva a cabo (Berton-Carabin *et al.*, 2014).

El azo-compuesto AAPH se descompone en N₂ y dos radicales de carbono que reaccionan con oxígeno molecular formando radicales peróxilos, los cuales fueron los que aceleraron la peroxidación del colesterol en la emulsión (Yuan *et al.*, 2005). En un estudio, se observó que 7-C no fue detectado a 0 M AAPH dentro de 24 h a 37 °C (Xu *et al.*, 2001), sino hasta 36 h (Tian *et al.*, 2011). Por consiguiente, 7-C a las 0 h no fue medida y la adición de 0.5 M AAPH a la emulsión permitió obtener concentraciones de 7-C en menor tiempo que el requerido sin un acelerador. De esta forma, se pudo evaluar el porcentaje de inhibición de 7-C causado por los antioxidantes extraídos de CT. Se utilizaron los extractos sometidos a un tiempo de reposo de seis horas, ya que fue el menor tiempo que expresó la mejor actividad antioxidante en los análisis anteriores.

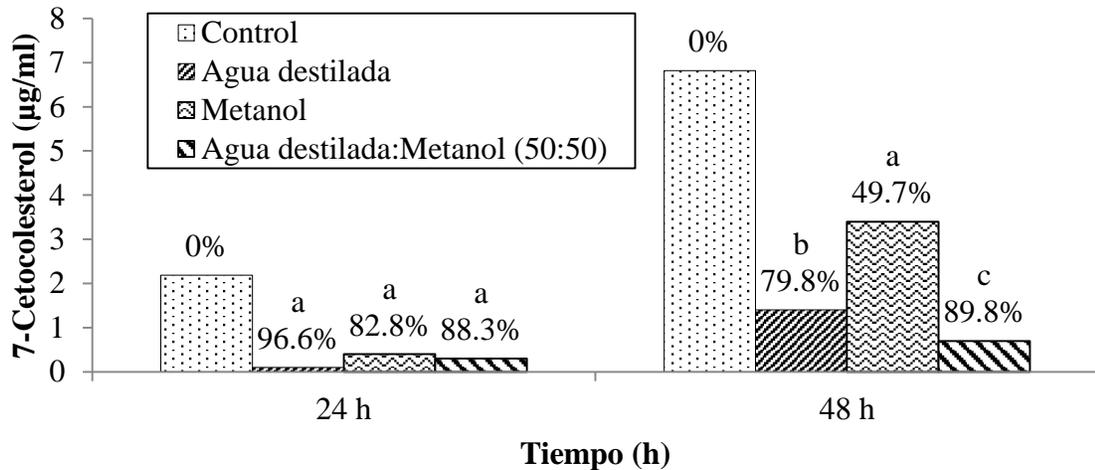


Figura 1. Porcentaje de inhibición de 7-cetocolesterol por extractos antioxidantes de *Clitoria ternatea* en tres distintos solventes con seis horas de reposo.

La inhibición de 7-C a las 24 h con los antioxidantes de CT extraídos con diferentes solventes no difirió ($P = 0.1090$). No hubo más de $0.4 \mu\text{g/ml}$ de 7-C presente en la emulsión (figura 1). Tuvo un coeficiente de variación del 26.4% y un $R^2 = 0.9259$, por lo que los datos se ajustaron al modelo. Sin embargo, a las 48 h se encontraron diferencias significativas entre la inhibición de estos extractos ($P = 0.0014$), con un coeficiente de variación del 3.4% y un $R^2 = 0.999$. El extracto en ADM inhibió el 89.8% de la producción de 7-C en la emulsión (figura 1), el mayor porcentaje de inhibición manifestado de entre los tres extractos. El extracto en metanol solamente inhibió aproximadamente el 50% de la producción de 7-C. Estos resultados concordaron con sus respectivos niveles de actividad antioxidante demostrado en el análisis DPPH (cuadro 3), donde el tratamiento ADM6 tuvo mayor capacidad antioxidante que el tratamiento M6. No obstante, estos resultados podrían variar si se realizara una distinta extracción metanólica, como propuesto anteriormente. Es decir, mayor agitación durante el proceso de extracción sin saturar el contenido del solvente podría obtener mayor rendimiento de antocianinas en un menor tiempo.

Por otro lado, el modelo de emulsión de colesterol esclareció las similitudes estadísticas entre el extracto en AD Y ADM. Los antioxidantes extraídos en ADM inhibieron la oxidación del colesterol en un 10% más que los antioxidantes extraídos en AD meramente. La polaridad parcial del methanol en el extracto en ADM dispuso de antocianinas metiladas o lipofílicas presentes en CT y por ende su expresión antioxidante en la emulsión (Welch *et al.*, 2008). Este comportamiento no pudo aprovecharse en el extracto en AD. A su vez, los resultados observados en la emulsión pura de colesterol no son enteramente idénticos a los que se encontrarían en sistemas alimenticios. En ellos, la presencia de otros componentes, como carbohidratos, proteínas, grasas y agua, podrían interactuar con los productos degradativos y dificultar el estudio de la oxidación del colesterol en dichos sistemas (Zhang, 2005).

Los antioxidantes extraídos de CT a pH 6 y pH 10 redujeron significativamente ($P = 0.0093$) la reacción de cadena de radicales libres a las 24 h que los antioxidantes extraídos a pH 2 (figura 2), con un coeficiente de variación del 25.4% y un $R^2 = 0.943$. Estos resultados no concordaron con su respectivo análisis DPPH (cuadro 6), donde se observó que el extracto de CT a pH 2 tuvo mayor actividad antioxidante. El antagonismo de los resultados evidenció las limitaciones del análisis DPPH. Éste sirvió para representar la forma en que el extracto de CT suprime la actividad de radicales libres o su capacidad de donar hidrógenos (Molyneux, 2004). Sin embargo, el análisis no utiliza un sustrato por lo que la reacción observada con el radical DPPH no fue útil para representar la característica protectora del extracto dentro de un sistema alimenticio lipídico. Adicionalmente, el radical DPPH es un radical estable de nitrógeno orgánico artificialmente creado que no se asemeja a radicales peróxilos inestables involucrados en la oxidación lipídica. Por ende, no resulta enteramente relevante compararlo con radicales lipídicos reales presentes en alimentos (Alamed, 2008). En una forma estequiométrica, solamente los buenos donadores de átomos de hidrógenos son probables a reaccionar con estos radicales estables (Schwarz *et al.*, 2001).

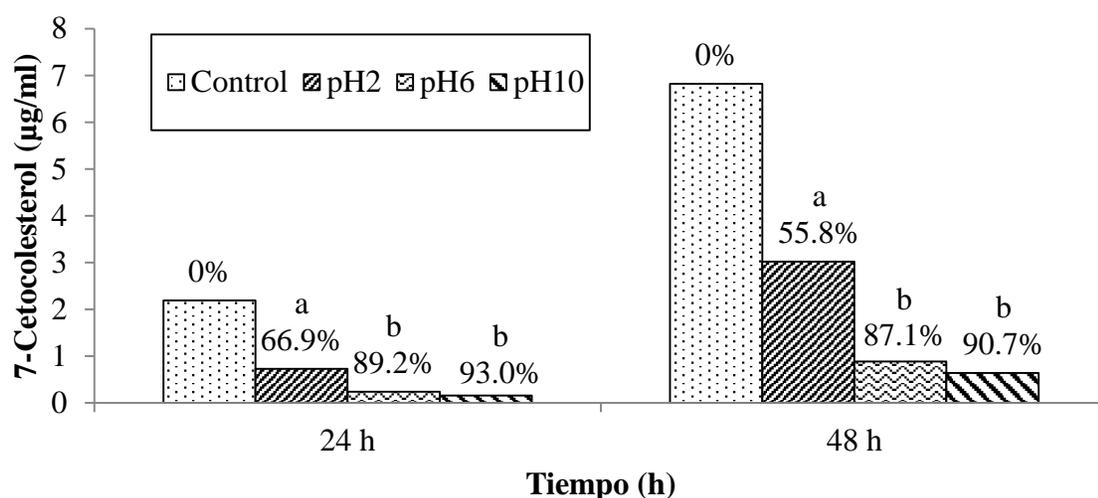


Figura 2. Porcentaje de inhibición de 7-cetocolesterol por extractos antioxidantes de *Clitoria ternatea* en agua destilada a tres niveles de pH con seis horas de reposo.

A las 48 h de acción antioxidante, hubo diferencia significativa en al menos uno de los tratamientos con extractos obtenidos a distintos pH ($P = 0.0016$), con un coeficiente de variación del 16.9% y un $R^2 = 0.977$. Los extractos obtenidos a pH 6 y pH 10 continuaron inhibiendo el mayor porcentaje de 7-C comparado con el generado en el control, 90.7% y 87.1% respectivamente. Su capacidad antioxidante se mantuvo constante a pesar que el producto oxidativo aumentara. Mientras que, los extraídos a pH 2 redujeron su actividad antioxidante en las emulsión después de 48 h.

La hidrólisis alcalina no afecta los enlaces glicosídicos, pero rompe los uniones éster de los grupos acilantes, por ejemplo ácidos cinámicos o ácidos alifáticos (Socaciu, 2008). Se ha visto que la peonidina-3-glucósido y la malvidina-3-glucósido, por su grado de metilación en el anillo B de la antocianidina, favorecen el color azul en una solución acuosa alcalina (Cabrita *et al.*, 1999). Así como estos grupos metilo pueden tomar el oxígeno del medio

para oxidarse en un grupo carboxílico inactivo, también la presencia de los mismos en una molécula le confiere un aumento en su lipofilicidad (Wermuth *et al.*, 2015). Se asume que esta posible lipofilicidad conferida a los antocianinas y demás compuestos bioactivos les concedió mayor efectividad antioxidante en la emulsión de colesterol, como lo dictado en el postulado de la paradoja polar. Esta paradoja establece que los antioxidantes lipofílicos se concentran en la interfase de una emulsión donde se asume que se lleva a cabo la oxidación lipídica (Berton-Carabin *et al.*, 2014). No obstante, han habido publicaciones que formulan hipótesis alternas donde los antioxidantes lipofílicos no son necesariamente los que expresan una mayor capacidad antioxidante en una emulsión (Laguerre *et al.*, 2015). En el presente estudio, las antocianinas obtenidas por hidrólisis ácida en agua destilada inhibieron más del 50% de la oxidación del colesterol (figura 2). Adicionalmente, un estudio concluyó que las antocianinas, por su estructura de múltiples anillos de carbono, tienen mayor oportunidad de proteger a las moléculas de colesterol del ataque de radicales libres en una emulsión que los tocoferoles lipofílicos. Los tocoferoles no podrían rodear con facilidad la estructura química de anillos múltiples del colesterol por su cadena larga de carbonos (Zhang *et al.*, 2013).

Al aplicar ciertas técnicas de conservación en los alimentos, la medición de 7-C podría ser un parámetro en calidad en productos lácteos, cárnicos, ovoproductos y frituras (Guardiola *et al.*, 1991). Por ejemplo, se ha identificado la presencia de 7-C en yema de huevo deshidratado, en productos de huevo en polvo con secado por aspersion, así como en alimentos horneados y galletas comerciales que los han utilizado como ingredientes (Tai *et al.*, 2000). El producto oxidativo 7-C se ha encontrado abundantemente en carne oxidada de pavo, res y caballo, así como ha estado presente durante el almacenamiento de carne fresca y en carne cocida (Rodríguez *et al.*, 2014). Incluso, se ha encontrado 7-C en leche en polvo y fórmula infantil debido al proceso de deshidratación que éstos conllevan. En mantequilla fresca, no se ha reconocido trazos de 7-C. No obstante, los productos oxidativos 7-C, 25-hidroxicolesterol y triol incrementaron cuando mantequilla almacenada se utilizó para cocinar a 170-180 °C por 10-20 min, siendo estos dos últimos los productos más tóxicos (Tai *et al.*, 2000).

4. CONCLUSIONES

- Se expresó la mayor capacidad antioxidante de la flor *Clitoria ternatea* tanto en el extracto en agua destilada como en la mezcla de solventes a las seis horas de reposo.
- El uso de una combinación de solventes para utilizar *Clitoria ternatea* como un antioxidante natural surge como una alternativa para la industria alimentaria en la prevención de oxidación del colesterol.
- Una hidrólisis ácida de antocianinas permitió una mayor cuantificación de antocianinas para su extracción de *Clitoria ternatea*. Sin embargo, las antocianinas extraídas a un pH básico evitan la oxidación del colesterol durante 48 h en una emulsión.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar los procesos de extracción de antocianinas con una mayor proporción de solvente y una agitación vortex repetidas veces.
- Evaluar la extracción de antocianinas de *Clitoria ternatea* en la mezcla de solvente de agua destilada y metanol (50:50) a los tres niveles de pH (2, 6 y 10).
- Realizar una extracción con y sin hidrólisis de pH que permita obtener antocianinas hidrofóbicas para confirmar con más detalle si el postulado de la paradoja polar es válida para los extractos de esta flor.

6. LITERATURA CITADA

Aguilera Ortíz, M., Reza Vargas, M., Chew Madinaveitia, R. G., y Meza Velázquez, J. A. 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas de la Salud* 8(2):16-22.

Alali, F., Tawaha, K., El-Elimat, T., Syouf, M., El-Fayad, M., y Abulaila, K. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project. *Natural Product Research* 21(12):1121-1131.

Alamed, J. 2008. Impact of chemical and physical properties on the ability of antioxidants to inhibit lipid oxidation in foods. Tesis M.Sc. Sci., Amherst, University of Massachusetts. 187 p.

Azuola, R., y Vargas, P. 2007. Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en marcha* 20(4):30-40.

Berton-Carabin, C. C., Ropers, M.-H., y Genot, C. 2014. Lipid Oxidation in oil-in-water emulsions: Involvement of the interfacial layer. *Comprehensive Reviews in Food Science and food Safety* 13(5):945-977.

Betigeri, S., Thakur, A., y Raghavan, K. 2005. Use of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride as a reagent tool for evaluation of oxidative stability of drugs. *Pharmaceutical Research* 22(2):310-317.

Blainski, A., López, G. C., y Palazzo de Mello, J. C. 2013. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules* 18:6852-6865.

Cabildo, M., García, A., López, C., y Santa María, M. 2011. *Química Orgánica*. Madrid: Universidad Nacional de Educación a Distancia.

Cabrita, L., Fossen, T., y Andersen, O. M. 1999. Colours of pore anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions during storage. *International Congress on Pigments in Food Technology PFT*. España. 217-221.

Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M., Rodríguez, J. A., y Galán-Vidal, C. A. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 113:859-871.

- Charles, D. 2013. *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*. Nueva York, Estados Unidos, Springer Science y Business Media. 610 p.
- Chayaratanasin, P., Barbieri, M. A., Suanpairintr, N., y Adisakwattana, S. 2015. Inhibitory effect of *Clitoria ternatea* flower petal extract on fructose-induced protein glycation and oxidation-dependent damages to albumin in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 15(27):1-9.
- Dai, J., y Mumper, R. J. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15:7313-7352.
- Echavarría, B., Franco, A., y Martínez, A. 2009. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 16(1):126-131.
- Gomez, S. M., y Kalamani, A. 2003. Butterfly pea (*Clitoria ternatea*): A nutritive multipurpose forage legume for the tropics - An overview. *Pakistan Journal of Nutrition* 6:374-379.
- Guardiola, F., Rafecas, M., Codony, R., y Boatella, J. 1991. Oxiesteroles: efectos biológicos, formación, contenido y determinación en alimentos. *Revista electrónica CSIC* 61-73.
- Junka, N., Kanlayanarat, S., Buanong, M., y Wongs-Aree, C. 2012. Characterisation of floral anthocyanins and their antioxidant activity in *Vanda* hybrid (*V. teres* x *V. hookeriana*). *Journal of Food, Agriculture & Environment* 10(2):221-226.
- Kaisoon, O., Siriamornpun, S., Weerapreeyakul, N., y Meeso, N. 2011. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. *Journal of Functional Foods* 88-99.
- Kungsuwan, K., Singh, K., Phetkao, S., y Utama-ang, N. 2014. Effects of pH and anthocyanin concentration on color and antioxidant activity of *Clitoria ternatea* extract. *Food and Applied Bioscience Journal* 2(1):31-46.
- Laguerre, M., Bayrasy, C., Panya, A., Weiss, J., McClements, D. J., Lecomte, J., y Villeneuve, P. 2015. What makes good antioxidants in lipid-based systems? The next theories beyond the polar paradox. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55(2):183-201.
- Lima, V. L., Melo, E., Pinheiro, I., y Guerra, N. 2011. Antioxidant capacity of anthocyanins from acerola genotypes. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos* 31(1):86-92.
- Molyneux, P. 2004. Use of DPPH to estimate antioxidant activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology* 25(2):211-219.
- Moon, J.-K., y Shibamoto, T. 2009. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1655-1666.

Morris, J. 2009. Characterization of butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) accessions for morphology, phenology, reproduction and potential nutraceutical, pharmaceutical trait utilization. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56:421-427.

Nollet, L. M. 2004. *Handbook of food analysis: residues and other food component analysis*. 2a ed., Vol. 2. Nueva York, Estados Unidos, Marcel Dekker.

Penazzi, G., Caboni, M., Zunin, P., Evangelisti, F., Tiscornia, E., Gallina Toschi, T., y Lercker, G. 1995. Routine High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Free 7-ketocholesterol in some Foods by Two Different Analytical Methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72(12):1523-1527.

Rabeta, M., y An Nabil, Z. 2013. Total phenolic compounds and scavenging activity in *Clitoria ternatea* and *Vitex negundo* linn. *International Food Research Journal* 20(1):495-500.

Rahman, M. S. 2007. *Handbook of food preservation*. 2a ed. Florida, Estados Unidos, CRC Press.

Rodriguez, M. T., García, G., y Lagarda, M. J. 2014. 7-Ketocholesterol as marker of cholesterol oxidation in model and food systems: When and how. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446:792-797.

Santos-Buelga, C., Escribano-Bailon, M. T., y Lattanzio, V. 2010. *Recent Advances in Polyphenol Research* (Vol. 2). Chichester, West Sussex: Wiley Blackwell.

Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L. R., Gardner, P. T., Heinonen, M. I., Hopia, A., y Tijburg, L. 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research and Technology* 212:319-328.

Shen, Y., Zhang, X., Prinyawiwatkul, W., y Xu, Z. 2013. Phytochemicals in sweet sorghum (*Dura*) and their antioxidant capabilities against lipid oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 12620-12624.

Sinha, K., Saha, P. D., Ramya, V., y Datta, S. 2012. Improved extraction of natural blue dye from Butterfly pea using microwave assisted methodology to reduce the effect of synthetic blue dye. *International Journal of Chemical Technology* 4(2):57-65.

Socaciu, C. 2008. *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*. Florida, Estados Unidos, CRC Press.

Tai, C. Y., Chen, Y. C., y Chen, B. H. 2000. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: An overview (part II). *Journal of Food and Drug Analysis* 8(1):1-15.

Tanaka, Y., Katsumoto, Y., Mizutani, M., Fukui, Y., y Togami, J. (8 de November de 2011). United States Patente n° US 8,053,634 B2.

Tian, L., Wang, H., Moursy Abdallah, A., Prinyawiwatkul, W., y Xu, Z. 2011. Red and white wines inhibit cholesterol oxidation induced by free radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 6453-6458.

Welch, C. R., Wu, Q., y Simon, J. E. 2008. Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. *Current Analytical Chemistry* 4(2):75-101.

Wermuth, C. G., Aldous, D., Raboisson, P., y Rognan, D. 2015. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 4a ed. California, Estados Unidos, Elsevier Academic Press.

Xu, Z., y Howard, L. R. 2012. *Analysis of antioxidant-rich phytochemicals*. Reino Unido, Wiley-Blackwell.

Xu, Z., Hua, N., y Godber, J. S. 2001. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:2077-2081.

Xu, Z., Zhang, T., Prinyawiwatkul, W., y Godber, J. 2005. Capabilities of different cooking oils in prevention of cholesterol oxidation during heating. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 82(4):243-248.

Yuan, Y. V., Carrington, M. F., y Walsh, N. A. 2005. Extracts from dulse (*Palmaria palmata*) are effective antioxidants and inhibitors of cell proliferation in vitro. *Food and Chemical Toxicology* 43:1073-1081.

Zapata, L. M., Heredia, A. M., Quinteros, C. F., Malleret, A. D., Clemente, G., y Cárcel, J. A. 2004. Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. *Ciencia, Docencia y Tecnología* 25(49):166-192.

Zhang, T. 2005. *Cholesterol oxidation in roasted salmon fish with different cooking oils*. Louisiana: Louisiana State University.

Zhang, X., Shen, Y., Prinyawiwatkul, W., King, J. M., y Xu, Z. 2013. Comparison of the activities of hydrophilic anthocyanins and lipophilic tocopherols in black rice bran against lipid oxidation. *Food Chemistry* 111-116.

Zhang, Z., Kou, X., Fugal, K., y McLaughlin, J. 2004. Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and anthocyanidins in bilberry extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:688-691.

Zingare, M. L., Zingare, P. L., Dubey, A. K., y Ansari, M. A. 2013. *Clitoria ternatea* (asparajita): A review of the antioxidant, antidiabetic and hepatoprotective potentials. *International Journal of Pharmacy and Biological Science* 3(1):203-213.