Contribución a la Caracterización y Evaluación de la Actividad Antioxidante de las Antocianinas del Fruto de Ivilan (*Monnina Obtusifolia* H.B.K)

Nelson H. Hurtado y Claudia Charfuelan

Universidad de Nariño, Departamento de Química, Grupo de Investigación en Productos de Importancia Biológica (GIPIB), Calle 18 Carrera 50, Campus Torobajo, San Juan de Pasto - Nariño – Colombia.
(e-mail: nhurtado@udenar.edu.co, claudiach1129@gmail.com)

Recibido Nov. 29, 2018; Aceptado Ene. 29, 2019; Versión final Mar. 5, 2019, Publicado Oct. 2019

Resumen

Mediante el uso de diferentes técnicas cromatográficas se obtuvieron extractos ricos en polifenoles (antocianinas). A partir de los extractos purificados se identificaron por primera vez las antocianinas mayoritarias del fruto de *Monnina Obtusifolia*: una piroantocianina y tres antocianinas derivadas de delfinidina, cianidina y peonidina. Se evaluó además la contribución relativa de diferentes tipos de fracciones aisladas del fruto (extractos crudos, purificados y compuestos puros) sobre sus propiedades antioxidantes. La antocianina con mayor poder para capturar el radical sintético ABTS^{•+} fue el compuesto derivado de delfinidina. Se encontró que las agliconas con un solo un grupo OH en el anillo B (4'-OH) presentan menor actividad antioxidante, comparado con compuestos que poseen agrupación 3',4' di-OH sustituidos como los derivados de delfinidina y cianidina. El análisis de la capacidad reductora de Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante equivalente al trolox de las fracciones aisladas sugieren que el fruto de *Monnina Obtusifolia* puede ser considerado como una fuente importante de compuestos bioactivos, para su uso en la industria.

Palabras clave: *Monnina obtusifolia*; antocianinas; antioxidantes; espectrometría de masas; resonancia magnética nuclear

Contribution to the Characterization and Evaluation of the Antioxidant Activity of Anthocyanins of Ivilan Fruit (*Monnina Obtusifolia* H.B.K)

Abstract

Through the use of different chromatographic techniques extracts rich in polyphenols (anthocyanins) were obtained. From the purified extracts, the main anthocyanins of the *Monnina Obtusifolia* fruit were identified for the first time: one pyroanthocyanin and three anthocyanins derived from delphinidin, cyanidin and peonidin. The relative contribution of different types of fractions isolated from the fruit (raw extracts, purified and pure compounds) on their antioxidant properties was also evaluated. The anthocyanin with greater power to capture the synthetic radical ABTS^{•+} was the compound derived from delphinidin. It was found that aglycones with only one OH group in the B ring (4'-OH) have lower antioxidant activity; compared to compounds possessing 3', 4' di-OH substituted group such as delphinidin and cyanidin derivatives. The analysis of the reducing capacity of Folin-Ciocalteu and the antioxidant capacity equivalent to trolox of the isolated fractions suggest that the fruit of *Monnina Obtusifolia* can be considered as an important source of bioactive compounds, for its use in the industry.

Keywords: *Monnina obtusifolia*; anthocyanins; antioxidants; mass spectrometry; nuclear magnetic resonance

INTRODUCCIÓN

El nombre científico del Ivilan ó Iguillán es *Monnina obtusifolia* H.B.K; pertenece a la familia Polygalaceae y al género *Monnina* el cual consta de unas 200 especies distribuidas desde el sureste de los Estados Unidos hasta Argentina, en la zona andina se encuentran unas 32 especies, sobre los 2400 m.s.n.m se han registrado 24 especies arbustivas, entre ellas, *M. obtusifolia* H.B.K. En Colombia esta especie está distribuida a lo largo de la región andina, a una altura entre los 2500 y 3300 m.s.n.m, en la zona del departamento de Nariño-Colombia, se encuentra en los municipios de Ipiales, Túquerres, Cumbal, Guachucal, Genoy y Nariño. La planta se describe como un arbusto de crecimiento lento que alcanza una altura entre 1 y 2 metros, con hojas alternas pecioladas y sus flores son de aspecto papilionáceo de color morado o rojizo. Su fruto en estado maduro es de color azul purpura, contiene la semilla embebida en una pulpa del mismo color y tiene una apariencia muy semejante al mortiño (*Vaccinium meridionale*). La forma varía entre redonda y ovalada y pesa alrededor de 0.100-0.180 g, los pobladores de la zona lo consumen ya que tiene un sabor agradable. Tradicionalmente su fruto se usa para el tratamiento de herpes simple y la curación de la Olanda (llagas en la boca). Por su matiz atractivo, brillante y por su solubilidad en agua, este fruto puede ser una fuente potencial de antocianinas que eventualmente puede remplazar a los colorantes sintéticos usados en alimentos.

Las antocianinas son pigmentos solubles en agua que pertenecen a la familia de los flavonoides (compuestos fenólicos), son glicosidos de antocianidinas derivados del 2-fenilbenzopirilio (ion flavilio) (Welch et al., 2008); que contienen dos anillos aromáticos (A y B) separados por un oxígeno que está formando un anillo heterocíclico de seis miembros (anillo C) (Zhao et al., 2017). Dentro de este grupo de compuestos también se han identificado piroantocianinas; moléculas que tienen un cuarto anillo heterocíclico entre los carbonos 4 y 5 (Mateus et al., 2003). Debido a la carga positiva del átomo de oxígeno en su molécula, las antocianinas tienen propiedades antioxidantes como donadores de hidrógeno (Kong et al., 2003). Generalmente las antocianinas están esterificadas con carbohidratos (azúcares) en la posición 3; los azúcares más comunes enlazados a antocianidinas son glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa y xilosa, aunque también pueden contener oligosacáridos como rutinosa, gentobiosa y soforosa; además, a estos azúcares podrían enlazarse diferentes ácidos orgánicos; los más comunes son ferúlico, cumárico, cinámico y malónico.

Las antocianinas son comúnmente sintetizadas por las plantas y son las responsables, bajo diferentes condiciones de pH, de los colores rojo, naranja, azul y púrpura de muchas flores, frutas y verduras (Bueno et al., 2012; Flores et al., 2016; Flores., 2017). La presencia de antocianinas en diversas partes de la planta es de gran importancia, se sabe que las antocianinas juegan un papel importante en la ecofisiología y en la propagación de plantas; ayudan a atraer polinizadores y participan en los mecanismos de defensa de las plantas contra factores de estrés bióticos y ambientales (Menzies et al., 2016). A las antocianinas y sus derivados se les han atribuido diferentes beneficios para la salud humana (He et al., 2010), se ha encontrado que son antioxidantes (Wang et al., 2018); anticancerígenos (Bontempo et al., 2015); tienen actividad antidiabética (Hong et al., 2013); contra la obesidad (Xie et al., 2018); previenen enfermedades cardiovasculares (Cassidy, 2018) y tienen potencial para prevenir la pérdida de memoria y enfermedades neurodegenerativas (Gutierrez et al., 2014). Bajo esta perspectiva, es de gran importancia buscar nuevas fuentes de este tipo de moléculas bioactivas. Este estudio centra su interés en el estudio de los pigmentos del fruto de Ivilan, que eventualmente podrían ser aprovechados como fuente de compuestos bioactivos para su uso en la industria farmacéutica o de alimentos.

Estudios sobre esta planta han demostrado que el extracto metanólico de las hojas de *Monnina obtusifolia* H.B.K tiene actividad anti-angiogénica, antibacterial, anti cáncer e inhibe el crecimiento placentar. Se ha encontrado además que las hojas contienen saponinas, xantonas, esteres de oligosacáridos y flavonoides (Lepore et al., 2011). Sin embargo, no existen investigaciones sobre los componentes que generan el color de la fruta, por lo que es de gran interés estudiar las características estructurales y capacidad antiradicalaria de este tipo de moléculas. Así, con el objetivo de valorar los polifenoles del fruto como fuente de compuestos bioactivos, en este trabajo de investigación el fruto de *Monnina obtusifolia* H.B.K se sometió a una caracterización química., para ello inicialmente se realizó un fraccionamiento y purificación de las antocianinas mayoritarias por UV-Vis, HPLC-ESI-MS y ¹H-RMN y posteriormente el estudio se complementó con la determinación de la capacidad antioxidante contra el radical ABTS^{•+} de cada fracción y compuesto purificado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los frutos se cosecharon en la vereda Ipualpud del municipio de Guachucal - Departamento de Nariño-Colombia. Las características del arbusto y la clasificación taxonómica se evaluaron en el Herbario de la Universidad de Nariño. Se colectó una muestra representativa de la población vegetal, colectando frutos en su estado de maduración fisiológico, de igual consistencia, tamaño y características visuales. Mediante un modelo de muestreo aleatorio simple de 10 plantas, se recolectó un peso aproximado de 2Kg. Los frutos se lavaron con agua, se homogenizaron y seleccionaron para el estudio 1000 g, posteriormente se refrigeraron a 4°C ± 1 hasta su análisis.

Reactivos

Los reactivos Folin-Cicalteau, ácido gálico, Trolox, metanol, HCl, acetona, acetonitrilo grado HPLC, agua grado HPLC, Trolox, ABTS se adquirieron de Sigma-Aldrich. La fase estacionaria Sephadex LH-20 se adquirió de Sigma Aldrich.

Fraccionamiento cromatográfico de los polifenoles

A partir de los frutos seleccionados, inicialmente se aisló un extracto metanólico que se denominó extracto crudo de Ivilan (EIC), luego con el propósito de aislar una muestra enriquecida en polifenoles, el EIC se sometió a un proceso de purificación mediante retención selectiva sobre columna cromatográfica, logrando un extracto de Ivilan purificado (EIP), posteriormente a partir del EIP se aisló, mediante cromatografía de exclusión por tamaño, una muestra rica en antocianinas monoméricas (ERM) y una fracción polimérica. Finalmente a partir del ERM se purificaron las antocianinas mayoritarias del fruto de Ivilan. A continuación se presentan los detalles metodológicos de este proceso:

Para el obtener el extracto crudo de Ivilan (EIC), inicialmente los frutos frescos y maduros (1 kg) se lavaron y posteriormente los frutos se maceraron por 8 horas en metanol-ácido acético (19:1, v/v); luego se centrifugó durante 10 min a 10.000 rpm y se filtró en un embudo Buchner; usando como medio filtrante papel con poro 11 µm. El solvente se removió al vacío a 40 °C y el residuo se liofilizó; este extracto se diluyó en agua (1:1 w/w) y porciones separadas de 100 g (disueltas en 100 ml de agua) se cargaron sobre una columna abierta que contenía como fase estacionaria un absorbente polimérico no iónico (Amberlita XAD-7) de dimensiones 80 x 4 cm d.i. Los pigmentos adsorbidos se lavaron con agua destilada y se eluyeron con 1 L de metanol-ácido acético (19:1 v/v); de acuerdo con el procedimiento descrito por Degenhardt et al. (2000), el eluyente se concentró al vacío a 40°C y la fase acuosa se liofilizó. El producto final fue un extracto de Ivilan purificado enriquecido en polifenoles (EIP). Por último, los taninos y las antocianinas del EIP se aislaron mediante el procedimiento descrito por Henke (1996). La muestra se disolvió en metanol; a continuación esta solución fue sometida a cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna empacada con Sephadex LH-20 Sigma (40 x 3 cm). La fracción de compuestos de bajo peso molecular (extracto de Ivilan rico en antocianinas monoméricas, ERM) se eluyó con una mezcla de metanol-agua (1:1) que contenía ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% y la fracción polimérica fue eluída con una mezcla de acetona-agua (2:1); con TFA al 0.1%. La fracción monomérica ERM se analizó por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada con espectrometría de masas HPLC-DAD-ESI-MS. Posteriormente las antocianinas mayoritarias se purificaron mediante HPLC semi-preparativa y se analizaron por ¹H-RMN.

Caracterización de las antocianinas monoméricas por HPLC-ESI-MS

La identificación parcial de los componentes se realizó en un espectrómetro de masas LCMS Shimadzu QP 2010; equipado con una interface electrospray. El voltaje del detector fue de 1.5 KV, flujo del gas nebulizador de 4.5 L/min, columna Phenomenex Luna 5 µm C18 100A, 250 x 4.6 mm, longitud de onda en detector UV 520 nm. Fase móvil A: Acetonitrilo:ácido fórmico:agua 3:10:87 (v/v/v); B: acetonitrilo:ácido fórmico:agua 50:10:40 (v/v/v). Gradiente: 6-20 %B; 0-20 min, 20-40 %B; 20-35 min, 40-60 %B; 35-40 min, 60-90 %B; 40-45 min, 90-6 %B; 45- 60 min. Flujo: 0.8 mL/min. Las muestras se disolvieron en 50 µL de la fase móvil B. Volumen de inyección de 5 µL. La cromatografía HPLC en modo semi-preparativo se realizó utilizando una columna Luna C₁₈ (10 mm x 250 mm: 5µm espesor de la película) y un detector UV 6000LP. Se aplicó un perfil de elución isocrático (95% A, 5% B), usando acetonitrilo, ácido fórmico y agua (Solvente A: 3:10:87, v/v/v; solvente B: 50:10:40, v/v/v), la velocidad de flujo fue de 4 ml/min por 20 min, inyectando alícuotas de 40 µL (250 mg/ml).

Resonancia magnética nuclear de las antocianinas

Las antocianinas aisladas se disolvieron en una mezcla de metanol-d₄-TFA-d₁ (19:1, v/v) y los espectros de ¹H-RMN se midieron en un equipo Bruker AMX-500.

Cuantificación de antocianinas monoméricas

El contenido de antocianinas monoméricas se calculó por cuantificación fotométrica; utilizando un espectrofotómetro (Merck, Spectroquant® Pharo 300, USA). El análisis se realizó usando el método del pH diferencial (Giusti y Wrolstad, 2003) y la concentración del pigmento se expresó como mg de cianidina 3-glucósido/g de extracto; usando la ecuación (1).

$$(\text{mg/g}) = (A \times \text{FD} \times \text{PM} \times V) / (\epsilon \times L) \quad (1)$$

Donde A: absorbancia a 520 nm, FD: factor de dilución, PM: peso molecular (cianidina 3-glucósido = 449.2 g/mol), V: volumen del extracto, ϵ : coeficiente de extinción molar (cianidina 3-glucósido = 26900 L/ mol.cm) y L: longitud de la celda (1 cm).

Capacidad reductora de Folin-Ciocalteu (CRFC)

La capacidad de reducción de Folin-Ciocalteu de los diferentes extractos de Ivilan (*Monnina Obtusifolia*) se evaluó por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999, Hurtado y Perez., 2014). Se mezcló una alícuota de 100 μL del extracto metanólico con 900 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu y la solución se mantuvo por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, luego de la adición de 750 μL de bicarbonato de sodio; la solución se agitó por 30 segundos y se mantuvo en reposo por 90 min a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 765 nm utilizando un espectrofotómetro (Merck, Spectroquant® Pharo 300, USA) y los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de ácido gálico por litro (mg EAG/L). Posteriormente la capacidad de reducción de Folin-Ciocalteu se expresó como miligramos de ácido gálico por 100 gramos de extracto seco.

Determinación de la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC)

La capacidad antioxidante se midió *in Vitro* con base en la habilidad de la muestra para capturar el radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (Re et al., 1999), el cual se genera por la oxidación de ABTS 7 mM con persulfato de potasio (2.45 mM) en agua. La solución de $\text{ABTS}^{\cdot+}$ se diluyó con boffer-fosfato (SBF) a pH 7.4 y luego fue almacenada por 16 horas en la oscuridad y a temperatura ambiente; hasta alcanzar una absorbancia de 0.70 ± 0.02 at 734 nm. Luego, 30 μL de cada muestra se mezcló con 3 ml de solución diluida de $\text{ABTS}^{\cdot+}$ y se agitó por 1 min. Después de esperar 6 min, se midió la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Merck, Spectroquant® Pharo 300, USA). Los datos se obtuvieron por interpolación de la absorbancia en la curva de calibración de Trolox (0.5-3.0 mM) y los resultados se expresaron como mmol de equivalentes Trolox/g de extracto seco.

Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado. El análisis estadístico se realizó usando Statgraphics Centurion 16.1.15, para el análisis unifactorial de varianza se usó el procedimiento ANOVA. Las diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las medias se determinaron usando la prueba de múltiples rangos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El fraccionamiento inicial del fruto permitió establecer que la cantidad de muestra soluble en metanol-ácido acético (19:1) (extracto de Ivilan crudo, EIC) corresponde al 25.1 % del fruto y la fracción retenida sobre la resina XAD-7 representa el 6.5 % del fruto (extracto de Ivilan purificado rico en polifenoles, EIP). En la tabla 1 se muestra la CRFC y el contenido de antocianinas monoméricas para estos dos extractos (EIC y EIP). Mediante el análisis ANOVA se observó que en estas dos fracciones existen diferencias significativas en la CRFC ($p < 0.05$), siendo la CRFC del EIP (18.46 mg EAG/g muestra) significativamente mayor que la del EIC, lo que demuestra la eficiencia de la columna para retener selectivamente los polifenoles de la muestra. Igual comportamiento se observa para el contenido de antocianinas de los extractos (Tabla 1).

Tabla 1: Capacidad reductora de Folin-Ciocalteu (CRFC), contenido de antocianinas y actividad antioxidante TEAC de las fracciones aisladas del fruto de Ivilan (*Monnina Obtusifolia*).

Muestra	A_{440}/A_{vis}	A_{acil}/A_{max}	TEAC (mmol trolox/g muestra)	Antocianinas (mg Cy-3-glu/g muestra)	CRFC (mg EAG/g muestra)
EIC	-	-	8.500 ± 0.08	3.81 ± 0.02	6.21 ± 0.04
EIP	-	-	3.307 ± 0.06	18.03 ± 0.09	18.46 ± 0.15
Antocianina 1	33.3	68.3	0.691 ± 0.04	-	-
Antocianina 2	22.4	66.5	1.638 ± 0.07	-	-
Antocianina 3	32.8	67.4	1.039 ± 0.05	-	-
Antocianina 4	32.5	61.3	1.136 ± 0.06	-	-
Ácido ascórbico	-	-	0.970 ± 0.01 (mmol trolox/mol) 5.5×10^{-3} mmol trolox/g	-	-

Mediante el método del pH diferencial se encontró que el contenido de antocianinas monoméricas en el fruto es de 95.3 ± 0.6 mg Cy-3-glu/ 100 g de fruto fresco y la capacidad reductora de Folin-Ciocalteu (CRFC) expresada en mg EAG/100 g de fruto es de 155.3 ± 6.2 que es mayor a la CRFC reportada para la fresa (132.1 mg EAG /100 g de fruta), uva (117.1 mg EAG/100 g de fruta) y guayaba (83 mg EAG/100 g de fruta), pero inferior a frutos como la Zarzamora: 248.5mg EAG /100 g de fruta y mortiño: 281.6 mg EAG/100 g de fruta (Kuskoski et al., 2004). Estos datos confirman el potencial uso de este fruto como fuente de colorantes naturales.

Caracterización de las antocianinas monoméricas por HPLC-ESI-MS

La cromatografía en fase reversa con gradiente de elución ha sido ampliamente utilizada para la separación y caracterización de compuestos fenólicos. Las condiciones cromatográficas usadas en este trabajo permitieron una buena separación de las antocianinas de la muestra y la identificación parcial de los pigmentos se confirmó por el ion molecular generado en espectrometría de masas con ionización electrospray en modo positivo (HPLC-ESI-MS).

Mediante el proceso de fraccionamiento adoptado, se aislaron las antocianinas monoméricas del EIP. Los compuestos polifenólicos del EIP se sometieron a fraccionamiento diferencial basado en su hidrofobicidad. De esta forma los compuestos menos hidrofóbicos; fracción menos retenida en Sephadex (antocianinas monoméricas), eluyeron de la columna en presencia de solventes más polares; metanol-agua (1:1) que contenía TFA al 0.1%. La fracción más retenida en Sephadex (fracción polimérica) se eluyeron con acetona-agua (2:1) que contenía ácido TFA al 0.1%. En la figura 1 se muestra el cromatograma HPLC-ESI-MS de la fracción rica en antocianinas monoméricas aislada del fruto de Ivilan (*Monnina Obtusifolia*), se observan cuatro antocianinas mayoritarias que representan ~97.6 % del área total, el compuesto 1 corresponde al 13.7%, el compuesto 2 el 60.9% (compuesto mayoritario), el 3 (13.7%) y el 4 el 9.3%.

Fig. 1: Cromatograma HPLC-ESI-MS de la fracción rica en antocianinas monoméricas aislada del fruto de Ivilan (*Monnina Obtusifolia*).

El extracto eluido de la columna de Sephadex (ERM) posteriormente se sometió a HPLC semi-preparativa, lográndose purificar los compuestos 1-4 (Figura1). Finalmente los compuestos purificados de caracterizaron por UV-Vis, HPLC-ESI-MS y ^1H -RMN. A partir de los espectros UV-Vis se logró elucidar alguna información estructural de dichos compuestos, se ha publicado que la longitud de onda de máxima absorción de las antocianinas se encuentra entre 500 y 530 nm (Giusti et al., 1999). Además, se ha encontrado que en la región visible; los derivados acilados de este tipo de pigmentos no muestran diferencia con respecto a los correspondientes no acilados, sin embargo; en la región del ultravioleta suelen presentar un máximo pronunciado en el intervalo 310-335 nm, correspondiente a la absorción del grupo acilo (Fossen y Andersen, 1999).

El análisis por UV-Vis del compuesto 1 presenta un máximo de absorción (λ_{max}) en 527 nm. El máximo de absorción localizado en la region de 500-530 nm y el cambio de color observado al variar el pH de una solución acuosa de este pigmento indican la presencia de pigmentos tipo antocianina. La absorción en la región 310-335 nm permite afirmar que hay acilación en esta molécula. De otro lado, para este pigmento se encontró una relación $A_{440}/A_{\text{vis-max}}$ de 33.3 % y una $A_{\text{acil}}/A_{\text{max}}$ de 68.3 % que evidencia una glicosidación en la posición C_3 de esta molécula. La literatura reporta además que una relación A_{440}/A_{vis} entre 20-35 %, sugiere una glicosidación en la posición 3 de la aglicona (Giusti et al., 1999) y una relación $A_{\text{acil}}/A_{\text{max}}$ con valores entre 50-70 % evidencia la presencia de grupos acilo (Wrostad et al., 2000); por lo tanto, los resultados muestran que todos los compuestos (1-4) presentan no solo sustitución en la posición 3 sino que también poseen grupos acilo (Tabla 1).

De acuerdo con los resultados del análisis HPLC-ESI-MS, la antocianina 1 con t_R 15.2 min y λ_{max} 538 nm se identificó por su peso molecular (M^+) y sus fragmentos en el espectro de masas. El espectro de este pigmento mostró un M^+ en m/z 775u ($C_{36}H_{39}O_{19}$) e iones fragmento en m/z 529 y 325u. El ion fragmento en m/z 529u puede explicarse por la pérdida de una hexosa (azúcar I) y un grupo acilo (ácido succínico) ($[M-146-100]^+$) y el ion fragmento en m/z 325u permite postular que este compuesto tiene como aglicona a la vinilpiranopeonidina. El ion correspondiente a la aglicona se genera por la pérdida adicional de un grupo acetilo (43u) unido a una hexosa (162u, azúcar II) ($[M+H-146-100-43-162]^+$).

Para la antocianina 1 el espectro RMN- 1H (Bruker AMX-500 MHz (metanol- d_4 -TFA- d_1 (19:1, v/v) mostró los desplazamientos químicos en ppm: 6.66 (1H, s, H-6), 6.80 (1H, s, H-8), 8.01 (1H, s, H-2'), 8.89 (1H, s, H-5'), 8.26 (1H, s, H-6'), 3.75 (3H, OCH_3), 7.00 (1H, sa, H-11), 8.40 (1H, d, H-12), 5.27 (1H, d, $J = 8.73$ Hz H-1''), 4.18 (1H, m, H-2''), 3.58 (1H, m, H-3''), 3.41 (1H, m, H-4''), 3.83 (1H, m, H-5''), 5.02 (H, d, $J = 3.85$ Hz H-1'''), 3.91 (H, m, H-2'''), 3.68 (H, m, H-3'''), 3.34 (H, m, H-4'''), 1.13 (H, d, H-6'''). Grupo: acetil: 2.32 (1H, s, H-2), grupo succinil: 2.53 (1H, s, H-3). Estos datos permitieron confirmar algunas características estructurales de las moléculas, a campo bajo del espectro de 1H -RMN se observaron cinco señales (6.66, 6.80, 8.01, 8.89 y 8.26 ppm). Con base en el desplazamiento químico y patrones de acoplamiento, la señal a 6.66 y 6.80 ppm se asignó a H-6 y H-8 respectivamente (Figura 2).

Fig. 2: Antocianinas mayoritarias identificadas en *Monnina Obtusifolia*.

Además, los 3H a 8.01, 8.89 y 8.26 se asignaron individualmente como H-2', H-5' y H-6' y el singlete a campo alto en 3.75 ppm corresponde a los protones del grupo $-OCH_3$. La ausencia de señal para H-4 en la aglicona propuesta y la presencia de señales en H-11 (singlete ancho en 7.00 ppm) y H-12 (doblete en 8.40 ppm) de la estructura pirano confirman la identidad de la aglicona como vinilpiranopeonidina. También en la zona de 3 a 5.5 ppm del espectro se observan señales características a las subunidades de azúcar. En esta zona se evidencia la presencia de dos unidades de azúcar por las señales en δ_H 5.27 (d, $J=8.73$); 5.02 (d, $J=3.85$) correspondientes a protones anoméricos, comprobando así la hipótesis planteada en el análisis por ESI-MS (dos subunidades de azúcar).

La configuración de los carbonos anoméricos fue establecida a través de la comparación de las constantes de acoplamiento encontradas para $J_{1''2''}$ (7.73 Hz; azúcar I), $J_{1'''2'''}$ (3.85 Hz; azúcar II) con las publicadas en la literatura: configuración α 1.5 Hz y configuración β 7.7 Hz (Andersen y Fossen, 2003); configuración α 1-4 Hz, configuración β 6-8 Hz (Agrawal, 1992); configuración α 3 Hz, configuración β 7.5 Hz (Matsufuji et al., 2003). De esta forma se estableció la configuración β del azúcar I (unida al C_3 , figura 2) y α de la otra unidad de azúcar. La señal en 1.23 (d, H-6''') correspondiente a un grupo metilo permite postular que la segunda unidad de azúcar posee este grupo en su estructura, lo que permite postular la presencia de ramnosa. Las demás señales son características de los azúcares I y II; permitiendo establecer que estas subunidades pueden ser glucosa y ramnosa respectivamente; desplazamientos que están de acuerdo con las publicadas en la literatura (Cabrita y Andersen, 2000).

Con base en las deducciones anteriores el pigmento 1 se identificó tentativamente como una piranoantocianidina: vinilpiranopeonidin-3-O- β -(acetil) glucopiranosil-O- α -(succinil) ramnosido. Las piranoantocianinas pertenecen a un grupo importante de pigmentos derivados de antocianinas que están presentes principalmente en frutas, alimentos procesados o en vino rojo (Rentzsch et al., 2007). Debido a su nuevo anillo pirano, se ha encontrado que este tipo de moléculas son mucho más estables hacia las variaciones de pH y blanqueamiento con SO₂. (Mateus et al., 2003).

Fig.3: (A) Cromatograma HPLC-DAD (520 nm) de la antocianina 2 aislada y purificada a partir de *Monnina Obtusifolia*, (B) Espectro UV-Vis, (C) Espectro de masas HPLC-ESI-MS.

Para la antocianina 2 (compuesto mayoritario) con t_R de 18.0 min y λ_{max} 543 nm; el espectro de masas mostró un ion molecular M^+ en m/z 1106u ($C_{49}H_{54}O_{29}$) y iones fragmento en m/z 904, 836, 728, 465 y 303u. El ion fragmento en m/z 303u sugiere para este compuesto la presencia de delfinidina como aglicona. Este fragmento puede explicarse por la pérdida de 803u lo que sugiere la pérdida de dos azúcares (hexosa y pentosa), dos unidades de ácido fumárico, ácido málico, dos unidades de ácido propiónico y ácido butírico $[M-162-146-2 \times 98-116-2 \times 56-71]^+$. El ion fragmento en m/z 904u se origina posiblemente por la pérdida de una hexosa y una unidad de ácido propiónico $[M-146-56]^+$. El ion en m/z 836u se genera por la pérdida de los ácidos málico, fumárico y propiónico $[M-116-98-56]^+$. El ion en m/z 728 sugiere la pérdida de 379u: dos unidades de ácido propiónico, dos unidades de ácido fumárico y una unidad de ácido butírico $[M-2 \times 56-2 \times 98-71]^+$. El ion fragmento en m/z 465u sugiere la presencia de la delfinidina (303u) unida a una hexosa (162u, posiblemente glucosa) (Figura 3).

Así mismo con base en el desplazamiento químico observado en el espectro de 1H -RMN para pigmento 2, se comprobaron algunas características estructurales de la molécula. Los desplazamientos químicos para esta molécula fueron: 8.22 (1H, s, H-4), 6.66 (1H, s, H-6), 7.02 (1H, s, H-8), 7.69 (1H, s, H-2'), 7.88 (1H, s, H-6'), 5.48 (1H, d, $J = 7.87$ Hz, H-1''), 3.57 (1H, m, H-3''), 3.59 (1H, sa, H-4''), 3.67 (1H, m, H-5''), 3.78 (1H, s, H-6''), 4.81 (1H, d, $J = 7.39$ Hz, H-1'''), 4.38 (1H, d, H-2'''), 3.75 (1H, d, H-4'''), 1.23 (1H, d, H-6'''), grupo propionil: 0.8 (1H, sa, H-2), 1.91 (1H, d, H-3), fumarico 5.70 (1H, d, $J = 12.1$), málico 2.80 (1H, dd). Las señales a 7.69s y 7.88s ppm se asignaron a los protones de la aglicona H-2' y H-6' respectivamente, igualmente los 2H a 7.02 y 6.66 ppm a H-8 y H-6, y un singlete en 8.22 ppm a H-4 (Figura 2). Estos desplazamientos químicos confirman la delfinidina como aglicona, fue evidente también la presencia de 2 azúcares por las señales características de dos protones anoméricos, el primero aparece en la región de 5.48d ppm (J 7.87 Hz, valor característico de la configuración β) (azúcar 1); como se mencionó anteriormente según la relación A_{440}/A_{max} este azúcar está unida a la posición 3 de la aglicona. El segundo protón anomérico aparece en la región de 4.81 ppm como un doblete, con una constante de acoplamiento de 7.39 Hz, valor característico de la configuración β (azúcar 2), para este azúcar se observó además la presencia de un singlete correspondiente a un grupo metilo en la región de 1.23 ppm, que sugiere que este azúcar es la ramnosa. Los datos UV-Vis, ESI-MS y RMN-H permitieron identificar tentativamente a esta molécula como delfinidina-3-O- β -(fumaroil, malioil, propionil) glucopiranosil-O- β -(fumaroil, butiroil, propionil) ramnósido.

El peso molecular de la antocianina 3 (t_R 18.9 min y λ_{max} 530 nm) se estableció con base en la señal del ion molecular M^+ en m/z 1037u ($C_{53}H_{49}O_{22}$) y iones fragmento en m/z 609u y 301. El ion en m/z 609u se origina por la pérdida de una hexosa y dos grupos acilo: p-cumárico y p-hidroxibenzoico [$M-162-146-120$] $^+$. El ión en m/z 301 sugiere la presencia de una unidad de peonidina y se genera por la fragmentación del ion en m/z 609u [$609-162-146$] $^+$ por la pérdida adicional de una hexosa y una unidad de ácido cumárico. Este análisis permitió postular a esta molécula como: Peonidin-3-O-(cumaroil) hexosa-O-(cumaroil, xidroxibenzoil) hexosa. Debido a la poca cantidad de muestra purificada por HPLC semi-preparativa, el compuesto **3** no se logró analizar por espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear protónica (1H -RMN).

Para la antocianina 4 con t_R 20.3 min y λ_{max} 528 nm se encontró un peso molecular de 875u ($C_{39}H_{39}O_{23}$) y iones fragmento en m/z 535, 449 y 287u, el ion fragmento en m/z 535u corresponde a la pérdida de una pentosa (puede ser xilosa) y dos grupos acilo (ácido propiónico y gálico) [$M-132-56-152$] $^+$. El ion en m/z 449u [$M-132-152-56-86$] $^+$ se origina posiblemente por la pérdida de ácido malónico y el fragmento en m/z 287u establece que la aglicona de esta antocianina es la cianidina, este ion genera a partir del ion m/z 449u por la pérdida adicional de una hexosa [$M-132-56-152-86-162$] $^+$. Los desplazamientos químicos para esta molécula fueron: 8.33 (1H, s, H-4), 6.68 (1H, s, H-6), 6.95 (1H, s, H-8), 7.55 (1H, s, H-2'), 7.09 (1H, s, H-5'), 8.26 (1H, s, H-6'), 5.48 (1H, d, $J = 7.74$, Hz H-1'), 3.79 (1H, sa, H-2'), 3.54 (1H, s, H-3'), 3.53 (1H, s, H-4'), 3.84 (1H, sa, H-5'), 5.89 (1H, m, H-6'), 5.30 (1H, d, $J = 7.71$ Hz, H-1'), 3.31 (1H, sa, H-2'), 3.56 (1H, sa, H-3'), 3.80 (1H, sa, H-5'), 1.19 (1H, s, H-2), 1.91 (1H, d, H-3). Grupo malonil: 3.42 (1H, m, H-2), grupo galoil: 7.05 (1H, s, H-2), grupo propionil: 0.8 (1H, sa, H-2). Un análisis similar permitió identificar tentativamente a esta molécula como: Cianidina-3-O- β -(malonil) glucopiranosil-O- β -(galoil, propionil) xilosido.

Capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC)

La actividad de captura del catión radical $ABTS^{\cdot+}$ ha sido extensamente usada para medir la capacidad antioxidante de diversos extractos de polifenoles, antocianinas y betalainas. El radical $ABTS^{\cdot+}$ es reducido por los antioxidantes mediante la donación de hidrógeno y el cambio de color puede ser cuantificado por la disminución de la absorbancia a $\lambda=734$ nm. Finalmente, la habilidad relativa para reducir el $ABTS^{\cdot+}$ se compara con el estándar Trolox. En la tabla 1 se muestra la capacidad de las diferentes muestras (EIC, EIP y antocianinas purificadas) para reducir el catión radical $ABTS^{\cdot+}$. En los ensayos se usó como control positivo el ácido ascórbico, el valor TEAC publicado en la literatura para el ácido ascórbico es de 1.05 mmol Trolox/mmol de compuesto (Re et al., 1999).

El análisis de los datos mediante el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, muestra que entre EIC y EIP existen diferencias estadísticamente significativas en el valor TEAC ($p < 0.05$); fue evidente una mayor capacidad de reducción (CRFC) y un mayor contenido antociánico para la muestra purificada (EIP); lo que evidencia la eficiencia del proceso de purificación mencionado anteriormente. Se ha establecido que muestras con una alta CRFC experimentan una fuerte actividad antioxidante (Rice Evans et al., 1996), sin embargo se observa que el valor TEAC del EIC es alrededor de 2.5 veces mayor que el del EIP (Tabla 1), este comportamiento sugiere que durante el proceso de purificación se eliminan compuestos (por ejemplo, carotenos, vitaminas, ácidos orgánicos, etc) que pueden ejercer algún efecto sinérgico en el extracto, ocasionando así una disminución de la actividad antioxidante, este comportamiento ya ha sido observado por Shi et al. (2014). De otro lado, un trabajo realizado por Bravo et al. (2016) muestra para el extracto metanólico del fruto de *Monnina speciosa* un valor TEAC de 0.0664 mmol trolox/g, que es inferior al encontrado en este trabajo para el extracto metanólico (EIC) de *Monnina Obtusifolia* (8.5 mmol trolox/g muestra).

Estadísticamente también se observó que entre las antocianinas 1: piranoantocianidina (vinilpiranopeonidin-3-O- β -(acetil) glucopiranosil-O- α -(succinil) ramnoso-do) y 3: Peonidin-3-O-(cumaroil) hexosa-O-(cumaroil, xidroxibenzoil) hexosa; ambas derivadas de la aglicona peonidina, existen diferencias significativas en el valor TEAC, lo que está en concordancia con lo publicado en la literatura, es decir que las piranoantocianinas son menos antioxidantes que las antocianinas (Sousa et al., 2013; 2016). En la tabla 1, también se puede observar que la antocianina 2: delfinidina-3-O- β -(fumaroil, malioil, propionil) glucopiranosil-O- α -(fumaroil, butiroil, propionil) ramnosido; un derivado de delfinidina (tres grupos OH en 3', 4', 5') es quien presenta la mayor actividad antioxidante (1.64 mmol trolox/g muestra), seguido por el compuesto 4: Cianidina-3-O-(malonil) glucopiranosil-O-(galoil, propionil) xilosido; un derivado de cianidina (dos grupos OH en 3' y 4').

Estos resultados de actividad antioxidante de los compuestos puros aislados de *Monnina Obtusifolia* nos llevan a la conclusión de que aquellas agliconas con solo un grupo OH en el anillo B (4'-OH) como las antocianinas 1 y 3 presentan menor actividad antioxidante comparado con compuestos que poseen agrupación 3',4' di-OH sustituidos como los derivados de delfinidina y cianidina (antocianinas 2 y 4 respectivamente) (Figura 2). Otros estudios han evidenciado la importancia de los grupos hidroxilos en la posición 3' y 4' del anillo B; sobre la mayor capacidad antioxidante de este tipo de moléculas (Rice-Evans et al., 1996).

Adicionalmente fue evidente que todos los compuestos purificados de Ivilan son más antioxidantes que el ácido ascórbico, así que; los antocianos aislados del fruto poseen importantes propiedades antioxidantes. Algunos estudios mencionan que diversas frutas pueden constituir una buena fuente de compuestos polifenólicos capaces de impactar positivamente en la salud humana (He et al., 2010). Por esta razón hay un gran interés en la aplicación de este tipo de compuestos en alimentos y en la industria nutracéutica y farmacéutica. De hecho hay gran evidencia que los polifenoles tienen propiedades antioxidantes (Ramírez et al., 2015), anticancerígenos (Bontempo et al., 2015), tienen actividad antidiabética (Hong et al., 2013), contra la obesidad (Xie et al., 2018), previenen enfermedades cardiovasculares (Cassidy, 2018) y tienen potencial para prevenir la pérdida de memoria y enfermedades neurodegenerativas (Gutierrez et al., 2014).

CONCLUSIONES

De los resultados mostrados, de su análisis y de su discusión, se pueden obtener las siguientes conclusiones con respecto a los polifenoles (antocianinas) aislados del fruto de *Monnina Obtusifolia*:

El contenido de antocianinas del fruto es de 95.3 ± 0.6 mg Cy-3-glu/ 100 g de fruto fresco.

Los análisis demuestran que las fracciones aisladas del fruto de *Monnina Obtusifolia*., por sus características antioxidantes (mayores a las del ácido ascórbico), pueden ser consideradas como una fuente importante de compuestos bioactivos para su uso en la industria.

Mediante la utilización de diferentes técnicas cromatográficas fue posible purificar las antocianinas mayoritarias del fruto de Ivilan, facilitando así su caracterización por HPLC-ESI-MS y ¹H-RMN. Se identificaron parcialmente: una piranoantocianina (compuesto 1), un derivado de la aglicona delfinidina (compuesto 2), un derivado de peonidina (compuesto 3) y otro de cianidina (compuesto 4).

La antocianina más antioxidante fue el derivado de delfinidina: delfinidina-3-O- β-(fumaroil, malioil, propionil) glucopiranosil-O-α-(fumaroil, butiroil, propionil) ramnosido

Se estableció que las agliconas con solo un grupo OH en el anillo B (4'-OH), como el derivado de peonidina, presenta menor actividad antioxidante comparado con compuestos que poseen agrupación 3',4' di-OH sustituidos como los derivados de delfinidina y cianidina.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico brindado por la Vicerrectoría de Investigaciones Postgrados y Relaciones Internacionales– VIPRI – UDENAR.

REFERENCIAS

- Agrawal, P.K, NMR Spectroscopy in the Structural Elucidation of Oligosaccharides and Glycosides, doi: 10.1016/0031-9422(92)83678-R, Phytochemistry, 31(10), 3307-3330 (1992)
- Andersen, Ø.M. y T. Fossen, Characterization of Anthocyanins by NMR, Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 1-24, John Wiley & Sons, New York, Estados Unidos (2003)
- Bontempo, P., L. de Masi y otros nueve autores, Anticancer Activities of Anthocyanin Extract from Genotyped Solanum tuberosum, doi: 10.1016/j.jff.2015.09.063, J. Funct. Foods, 19, 584-593 (2015)
- Bravo, K., F. Alzate y E. Osorio, Fruits of selected wild and cultivated Andean plants as sources of potential compounds with antioxidant and anti-aging activity, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.12.074, Ind Crops Prod, 85, 341–352, (2016)
- Bueno, J.M., P. Sáez-Plaza y otros cuatro autores, Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments, doi: 10.1080/10408347.2012.680343, Crit. Rev. Anal. Chem., 42(2), 126-151 (2012)
- Cabrita, L. y Ø.M. Andersen, Anthocyanin Trisaccharides in Blue Berries of Vaccinium padifolium, doi: 10.1016/S0308-8146(99)00230-7, Food Chem., 69, 33-36 (2000)
- Cassidy, A., Berry Anthocyanin Intake and Cardiovascular Health, Mol. Aspects Med., 61(6), 76-82 (2018)
- Dehenhardt, A., H. Knapp y P. Winterhalter, Separation and Purification of Anthocyanins by High-Speed Countercurrent Chromatography and Screening for Antioxidant Activity, J. Agric. Food Chem., 48 (2), 338-343 (2000)
- Flores, E., Extracción de Antioxidantes de las Bayas del Sauco (*Sambucus nigra* L. subsp. *peruviana*) con Ultrasonido, Microondas, Enzimas y Maceración para la obtención de Zumos Funcionales, doi: 10.4067/S0718-07642017000100012, Inf. Tecnol, 28(1), 121-132 (2017)
- Flores, F.P., R.K. Singh y F. Kong, Anthocyanin Extraction, Microencapsulation, and Release Properties During in vitro Digestión, Food Rev Int., 32(1), 46-67 (2016)

- Giusti, M. y R.E. Wrolstad, Acylated Anthocyanins from Edible Sources and their Applications in Food Systems, *Biochem. Eng. J.*, 14(3), 217-225 (2003)
- Giusti, M.M., L.E. Rodriguez y R.E. Wrolstad, Molar Absortivity and Color Characteristics of Acylated and no-acylated Pelargonidin-based Anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4631-4637 (1999)
- Gutierrez, J.M., F.B. Carvalho y otros diez autores, Neuroprotective Effect of Anthocyanins on Acetylcholinesterase Activity and Attenuation of Scopolamine-Induced Amnesia in Rats, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 33, 88-97 (2014)
- He, J.A. y M. Giusti, Anthocyanins: Natural Colorants with Health Promoting Properties, *Annu. Rev Food Sci. Technol.*, 1, 163-187 (2010)
- Henke, H., Preparative Gel Chromatography on Sephadex LH-20, *Journal Fur Praktische Chemie Chemiker-Zeitung*, 338 (1), 291-295 (1996)
- Hong, S.H., J.I. Heo y otros diez autores, Antidiabetic and Beta Cell-Protection Activities of Purple Corn Anthocyanins, *Biomol Ther*, 21, 284-289 (2013)
- Hurtado, N.H. y M. Pérez, Identificación y Actividad Antioxidante de las Antocianinas Aisladas del Fruto de Capulí (*Prunus serótina* spp capulí (Cav) Mc. Vaug Cav), doi: 10.4067/S0718-07642014000400015, *Inf. Tecnol*, 25 (4), 131-140 (2014)
- Kong, J.M., L. Chia, N. Goh y T. Chia, Analysis and Biological Activities of Anthocyanins, *Phytochemistry*, 69, 1939-1940 (2003)
- Kuskoski, M. y A. Asuero, Actividad Antioxidante de Pigmentos Antocianicos, *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 24, 691-693 (2004)
- Lepore, L., N. Malafronte y otros cinco autores, Isolation and Structural Characterization of Glycosides from an Anti-angiogenic Extract of *Monnina obtusifolia* H.B.K, doi: 10.1016/j.fitote.2010.08.018, *Fitoterapia*, 82(2), 178-183 (2011)
- Mateus, N., A.M.S. Silva y otros tres autores, A New Class of Blue Anthocyanin-Derived Pigments Isolated from Red Wines, *J. Agric. Food Chem.*, 51(7), 1919-1923 (2003)
- Matsufuji, H., T. Otsuki y otros tres autores, Identification of Reaction Products of Acylated Anthocyanins from Red Radish with Peroxyl Radicals, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3157-3161 (2003)
- Menzies, I.J.L., W. Youard y otros cinco autores, Leaf Colour Polymorphisms: A Balance between Plant Defence and Photosynthesis, *J. Ecol.*, 104, 104-113 (2016)
- Re, R., N. Pellegrini y otros cuatro autores, Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay, *Free Radic. Biol. Med.*, 26 (9), 1231-1237 (1999)
- Rentzsch, W., M. Schwarz y P. Winterhalter, Pyranoanthocyanins - an Overview on Structures, Occurrence, and Pathways of Formation, *Trends Food Sci. Technol.*, 18(10), 526-534 (2007)
- Rice Evans, C.A. y N.J. Miller, Antioxidant Activities of Flavonoids as Bioactive Components of Food, *Biochem. Soc. Trans.*, 24(3), 790-795 (1996)
- Rice-Evans, C.A., N.J. Miller y G. Papaganda, Structure Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids, *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 933-956 (1996)
- Shi, J., Y. Kakuda y D. Yeung, Antioxidative properties of lycopene and other carotenoids from tomatoes: synergistic effects, *Biofactors*, 21(1-4), 203-210 (2004)
- Singleton, V.L., L. Orthofer y R.M. Lamuela-Raventós, Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin Ciocalteu Reagent, doi: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1, *Meth. Enzymol.*, 299 (1), 152-178 (1999)
- Sousa, A., P. Araújo y N. Mateus, Deoxyvitisins: A New Set of Pyrano-3-deoxyanthocyanidins, *Tetrahedron Lett*, 28, 4785-4788 (2013)
- Sousa, A., P. Araújo y otros cuatro autores, Antioxidant and Antiproliferative Properties of 3-deoxyanthocyanidins, *Food Chem*, 192(1), 142-148 (2016)
- Wang, Y., G. Luan y otros cinco autores, Subcritical Water extraction, UPLC-Triple-TOF/MS Analysis and Antioxidant Activity of Anthocyanins from *Lycium Ruthenicum* Murr, *Food Chem.*, 249, 119-126 (2018)
- Welch, C.R., Q. Wu y J.E. Simon, Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization, *Curr. Anal Chem.*, 4(2), 75-101 (2008)
- Wrolstad, R., *Natural Food Colorants*, 237-252, Marcel Dekker Inc, New York, Estados Unidos (2000)
- Xie, L., H. Sua y otros tres autores, Recent Advances in Understanding the Anti-obesity Activity of Anthocyanins and their Biosynthesis in Microorganisms, *Trends Food Sci. Technol.*, 72, 13-24 (2018)
- Zhao, C.L., Y.Q. Yu y otros cinco autores, Stability-Increasing Effects of Anthocyanin Glycosyl Acylation, *Food Chem*, 214, 119-128 (2017)