

Evaluación de métodos de extracción de las antocianinas del fruto de *Eugenia malaccensis* y su caracterización por HPLC-ESI-MS

*Evaluation of methods of extraction of the anthocyanins of the fruit of *Eugenia malaccensis* and its characterization by HPLC-ESI-MS*

**MSc. Ivone Vanessa Jurado-Dávila, MSc. Diego Francisco-Cifuentes,
Dr. Nelson Humberto-Hurtado**

vannessa_jd@hotmail.com

**Departamento de Química, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Nariño,
Pasto, Colombia**

Recibido: 25 de marzo de 2019

Aprobado: 13 de diciembre de 2019

Resumen

El fruto de *Eugenia malaccensis* (Pomorroso), en su estado maduro presenta una coloración rojo intenso; fuente potencial de polifenoles. En este trabajo se realiza la extracción de estos compuestos polifenólicos tipo antocianina, presentes en la cáscara del fruto, aplicando un diseño experimental aleatoriamente comparativo. El objetivo del diseño es evaluar la eficiencia de tres metodologías de extracción: con solventes (ES), asistida con microondas (EAM) y extracción-fermentación simultánea (EFS). Los resultados obtenidos indicaron que el método que presentó mayor eficiencia fue la EFS, con concentración de antocianinas monoméricas y contenido de 79,71 mg de cianidina-3-glucósido/100 g de fruto ($P < 0,05$). El análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-ESI-MS) permitió establecer que la cáscara del fruto es rica en tres posibles derivados de cianidina: cianidina-3,5-dihexosido, cianidina-3-glucósido y cianidina-3-galactósido.

Palabras clave: *Eugenia malaccensis*, métodos de extracción, antocianinas y cromatografía líquida de alta eficiencia.

Abstract

Eugenia malaccensis (Pomorroso) fruit, whose ripening has an intense red coloration and is a potential source of polyphenols. In the present work, the extraction of the anthocyanin-type polyphenolic compounds present in the fruit shell was carried out by implementing a randomly comparative experimental design, with the objective of evaluating the efficiency of three different extraction methodologies: with solvent (ES), assisted with microwave (EAM) and simultaneous extraction-fermentation (EFS). The results obtained indicated that the highest efficiency for the extraction of anthocyanins was the EFS, with a concentration of monomeric anthocyanins and content of 79,71 mg of cyanidine-3-glucoside/ 100 g of fruit ($P < 0,05$). The high efficiency liquid chromatography analysis coupled to mass spectrometry (HPLC-ESI-MS) allowed to establish that the fruit peel is rich in three possible cyanidine derivatives: cyanidine-3,5-dihexoside, cyanidine-3-glucoside and cyanidine-3-galactoside.

Keyword: *Eugenia malaccensis*, extraction methods, anthocyanins and high efficiency liquid chromatography.

Introducción

La especie objeto de estudio, *Eugenia malaccensis* (pomorroso), pertenece a la familia MYRTACEAE y atrae la atención de investigadores, debido a que sus frutos muestran altos contenidos de compuestos bioactivos, que a menudo están relacionados con efectos beneficiosos para la salud humana [1,2]. Dicho fruto es de forma globosa con cáscara de color rojo, de textura lisa y brillante, con pulpa blanca y semilla. Esta especie no es nativa de América y tiene su origen en Malasia. Sin embargo, se adaptan muy bien a ambientes tropicales de varias regiones de Centro América y América de Sur, como Colombia y Brasil, entre otros [3,4].

En Colombia, el aprovechamiento del fruto es limitado, siendo prácticamente su consumo en forma natural. Esto ocasiona que en el periodo de cosecha la mayor parte de éste se pierda, por lo tanto, es de gran interés estudiar la composición química responsable de su color. En muchas partes del mundo, los componentes fenólicos presentes en este tipo de especie se han utilizado en medicina popular para tratar diversas enfermedades como: diabetes, inflamación e hipertensión, resaltando su aplicación farmacéutico [3,5]. La pigmentación natural de la cáscara del fruto se debe a los polifenoles tipo antocianinas. Estos compuestos pertenecen a un subgrupo de flavonoides solubles en agua y responsables de una amplia gama de colores observados en la naturaleza [6,7].

Las antocianinas muestran también aplicaciones industriales, entre las cuales se encuentra su uso como colorantes naturales en la elaboración de alimentos, como sustituyente de los colorantes sintéticos [6]. Es importante resaltar que las preocupaciones en cuanto a la seguridad de los colorantes artificiales, han despertado interés en su remplazo por colorantes de origen natural, no solo por su estabilidad, sino también por su potencial beneficio para la salud humana. Además de ello, desde el punto de vista estético es de gran importancia, debido a que el aspecto y el color de los alimentos juega un papel importante en la aceptación o rechazo del mismo, por parte de un consumidor [8-9]. Por lo tanto, es de gran interés el estudio de métodos de extracción de este tipo de compuestos, que generen una buena eficiencia y que además no afecten su estabilidad, la cual se puede ver modificada por factores como pH y luz [10].

Existen diferentes métodos de extracción, entre los procesos rutinarios se encuentra la extracción con solventes (ES), que es un método convencional que genera una buena eficiencia. Sin embargo, no es selectivo y se obtiene un alto contenido de subproductos

que pueden acelerar la degradación de las antocianinas [11]. Recientemente, se han propuesto diferentes técnicas de extracción alternativas, como la extracción asistida por radiación con microondas (EAM) [12] y el método de extracción-fermentación simultánea usando levaduras (EFS) [13]. Estos procesos permiten una extracción de los compuestos de interés con mayor eficiencia, selectividad, bajo consumo de disolventes o ausencia de ellos, y un alto nivel de automatización [14,15].

En este sentido, el objetivo de este estudio fue evaluar y comparar la eficiencia de tres metodologías de extracción de los polifenoles tipo antocianina presentes en la cáscara en el fruto de *Eugenia malaccensis*, mediante las técnicas ES, EAM y EFS, y caracterizar sus componentes mayoritarios mediante la técnica HPLC-ESI-MS.

Materiales y métodos

El trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Productos Naturales del Departamento Química de la Universidad de Nariño, municipio de San Juan de Pasto-Colombia. La planta de pomarroso fue caracterizada en el herbario de dicha Universidad, bajo el código ID:593 como *Eugenia malaccensis*.

Los diferentes solventes usados en la extracción de los analitos de interés, así como los reactivos o catalizadores empleados en el desarrollo de las reacciones y los patrones utilizados en su cuantificación fueron grado analítico o estándar, de las marcas Sigma-Aldrich Inc., Merck KGaA, y PanReac AppliChem.

Materias primas vegetales

Las muestras del fruto estudiado, fueron recolectadas en el municipio de Puerto Asís del departamento del Putumayo, Colombia durante el mes de agosto, época más cálida del año donde existe la mayor producción del fruto. El muestreo fue realizado de forma aleatoria en una hectárea de terreno y se selecciona una cantidad de 10 frutos por cada árbol silvestre. La selección se realizó teniendo en cuenta el mayor estado de maduración del fruto (tonalidad de color más intensa).

En total se cosecharon 5 Kg de frutos, estos fueron lavados con hipoclorito de sodio al 2% y secados a temperatura ambiente (temperatura promedio de 25°C y humedad relativa de 80%) durante 6 h. Finalmente fueron empacados y transportados hasta el laboratorio de Productos Naturales, manteniendo una temperatura no mayor a 4°C.

Obtención de los extractos crudos ricos en antocianinas

Los procesos de extracción se realizaron siguiendo un diseño experimental aleatoriamente comparativo con 3 unidades experimentales establecidas en el presente estudio. Las variables dependientes adoptadas fueron los tres métodos de extracción ES, EAM y EFS, y las variables dependientes estudiadas fueron el contenido de fenoles totales, antocianinas monoméricas y poliméricas. En este estudio cada unidad experimental correspondía a un lote de procesamiento independiente de 100 g de cáscara del fruto de *Eugenia malaccensis*, los cuales se obtuvieron realizando cortes manuales.

Extracción con solventes (ES)

La extracción convencional se realizó siguiendo la metodología propuesta por Fan y colaboradores [15] con algunas modificaciones. Las muestras se maceraron durante 24 horas a través de 8 ciclos extractivos, a temperatura ambiente y en ausencia de luz. En cada ciclo fueron usados 500 mL de una solución de ácido clorhídrico 0.05 N y etanol 95% en relación 15:85. Una vez finalizados los ciclos extractivos se conformó un único extracto, se filtró y se llevó a sequedad a 40°C por medio de un rotaevaporador Laborota 4000-Heidolph, Alemania.

Extracción asistida con microondas (EAM)

El extracto crudo obtenido por EAM se obtuvo siguiendo la metodología propuesta por Yang & Zhai [16]. La cáscara del fruto se introdujo en un balón provisto de un sistema de refrigeración al cual se le adicionaron 500 mL de una solución de ácido clorhídrico 1.5 M y etanol 95%, en relación 15:85. Luego se calentó en un equipo microondas Inverter NN-ST965SRPH (Panasonic, México) en un tiempo de 19 min, a una potencia de 555 W. Se aplicaron 8 ciclos extractivos bajo las mismas condiciones. Se conformó un único extracto, se filtró y se llevó a sequedad a 40°C por medio de un rotaevaporador Laborota 4000-Heidolph, Alemania.

Extracción-fermentación simultánea (EFS)

En este caso el extracto crudo se obtuvo mediante la fermentación alcohólica de la muestra, usando levaduras mediante la metodología propuesta por Fan y colaboradores [15]. La cáscara del fruto se lava con agua destilada y se maceró con 500 mL solución de ácido cítrico estéril inoculado con 4 g de *Saccharomyces cerevisinas*, permitiendo una fermentación por 72 h a una temperatura controlada de 30°C. Se aplicaron 8 ciclos extractivos bajo las mismas condiciones. Se conformó un único extracto, se filtró,

concentró a 40°C y centrifugó en una centrifuga Universal 320 R-Hettich, Alemania a 1776 rpm.

Análisis del contenido de fenoles totales

El contenido total de fenoles fue determinado mediante el método Folin-Ciocalteu [17]. Para cada extracto se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV/VIS V-503 (Jasco, Japón). Previamente se construyó una curva de calibración utilizando soluciones patrón de 50, 100, 150, 250 y 500 ppm de ácido gálico, encontrándose un coeficiente de correlación $R^2=0,9997$. Los resultados de los análisis se expresaron en mg de ácido gálico/100 g de fruta.

Evaluación del contenido de antocianinas monoméricas

El contenido total de antocianinas monoméricas en los diferentes extractos se determinó mediante el método de pH diferencial [11]. Se usó un espectrofotómetro UV/VIS V-503 (Jasco, Japón) para medir las absorbancias a 520 y 700 nm en las muestras, con un paso óptico de 1 cm de espesor. El contenido de antocianinas monoméricas se expresó como equivalentes de cianidina-3-glucósido/100g de muestra. Para el cálculo se utilizó las siguientes expresiones matemáticas.

$$A = (A_{\lambda_{max}} - A_{700})_{pH1} - (A_{\lambda_{max}} - A_{700})_{pH4.5}$$

$$\text{Antocianinas monoméricas (mg/L)} = \frac{(A * PM * FD * 1000)}{\epsilon * l}$$

donde

λ_{max} : 518nm,

FD: factor de dilución,

PM: masa molecular de cianidina-3-glucosido (449.2g/mol),

ϵ : Absortividad molar de cianidina-3-glucosido= (26900Lmol⁻¹cm⁻¹),

l: espesor de la celda.

Evaluación del contenido de antocianinas poliméricas

El contenido total de antocianinas poliméricas o color polimérico en los diferentes extractos se estimó usando la metodología reportada por Lotfi y colaboradores [18], realizando ensayos de decoloración con Na₂S₂O₅. Igualmente se usó un espectrofotómetro UV/VIS V-503 (Jasco, Japón) para medir las absorbancias a 520 y 700 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de color polimérico.

Determinación de la eficiencia de extracción

En los diferentes extractos se utilizaron como variables de respuesta: fenoles totales, cantidad de antocianinas monoméricas y cantidad de antocianinas poliméricas. Los datos se analizaron mediante el software estadístico Statgraphics Centurion XVI (Statgraphics Technologies, Inc., EEUU). Para identificar las diferencias significativas ($P < 0,05$) se usó el análisis de varianza (ANOVA-simple) y la prueba de contrastes de Tukey HSD. Todos los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado. Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar ($n = 3$).

Purificación del extracto crudo

Para purificar el extracto crudo con mayor contenido fenólico, inicialmente se eliminó la presencia de compuestos lipofílicos y medianamente polares. Para esto se realizó una separación con solventes usando una mezcla de 50 mL de agua destilada/ 20 mL de n-hexano/ 20 mL de acetato de etilo. La fase acuosa obtenida se cargó sobre una columna cromatográfica empacada con amberlita XAD-7 (Sigma-Aldrich, EEUU), la fase móvil utilizada en la elución de los compuestos incoloros de baja polaridad fue agua destilada, y finalmente el extracto rico en antocianinas retenido en la columna se eluyó con una solución de etanol 95 % / HCl 0,05N en relación 85:15, y el extracto obtenido posteriormente se concentró hasta sequedad.

Una vez seco el extracto, se realizó un fraccionamiento de las antocianinas monoméricas y poliméricas mediante cromatografía de exclusión por tamaño, utilizando como fase estacionaria Lipophilic Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia Biotech Co., Ltd., Suecia). Y como fase móvil metanol / ácido fórmico al 0,1 % en relación 1:4. Finalmente, el extracto de antocianinas poliméricas se eluyó con acetona/ácido fórmico al 0,1% en relación 2:1, concentradas a 40°C [17].

Caracterización de las antocianinas monoméricas por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-ESI-MS)

La separación e identificación de las antocianinas por HPLC se realiza adaptando las condiciones reportadas por He y colaboradores [17]. Inicialmente las muestras se filtraron a través de un filtro de nylon de 0.45 μm (Sigma Aldrich, EE. UU.) y se inyectaron (5 μL) en un equipo de cromatografía LC-MS 2010 (Shimadzu, Japón), equipado con una bomba cuaternaria, detector de arreglo de diodos UV-vis y software Shimadzu LC-MS para el procesamiento de datos.

Para el análisis por espectrometría de masas se utilizó un equipo LC 2010 (Shimadzu, Japón). El equipo operó a una temperatura de 230°C, con un voltaje del detector de 1,95 kV en un rango de 50-800 m/z y un flujo de gas nebulizador de 1,5 L/min.

La mezcla de solventes usada fue la siguiente: agua, acetonitrilo y ácido fórmico en relación 87:3:10 (eluyente A) y una mezcla de agua, acetonitrilo y ácido fórmico en relación 40:50:10 (eluyente B). Los compuestos se separaron en una columna Kinetex C18 de 150 x 2,1 mm y 2,6 µm de tamaño de partícula (Phenomenex, EEUU) a una temperatura 25 °C y flujo de 0,4 ml / min. El gradiente de elución usado en el método cromatográfico fue el siguiente: 6-20 % B (0-10 min), 20-40 % B (10-20 min), 40-50 % B (20-30 min) y 50-60 % (30-35 min). El tiempo de equilibrio entre corridas fue de 10 min. Las antocianinas fueron detectadas a 520 nm.

Resultados y discusión

Comparación de las eficiencias de extracción

El criterio de selección del mejor método de extracción se basó en la metodología que ofreció la recuperación más alta y donde la degradación de las antocianinas se evidencia por la variación de la coloración [19].

En análisis de polifenoles y antocianinas, la extracción con solventes es el paso inicial, previo a la cuantificación, purificación, separación y caracterización [19]. La estabilidad de estos compuestos fenólicos es fácilmente afectada por las condiciones de extracción [20,21], modificando así los resultados en cuanto a estos rendimientos. La tabla 1 muestra las variables respuesta que se tuvieron en cuenta en la evaluación de la eficiencia de extracción entre las tres metodologías estudiadas.

Tabla 1. Comparación de la eficiencia de extracción de los métodos no convencionales (EAM y EFS) con la extracción con solventes (es)

| Variable de respuesta | Método de extracción | | |
|--|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | ES | EAM | EFS |
| Extracto crudo (%) | 10,3 ± 0,6 ^a | 7,9 ± 0,3 ^b | 7,0 ± 0,5 ^c |
| Fenoles totales (mg de ácido gálico/100 g de fruta.) | 332,30 ± 4,48 ^a | 263,68 ± 4,62 ^b | 200,68 ± 4,72 ^c |
| Antocianinas monoméricas (mg de cianidina-3-glucósido / 100 g de fruto) | 58,09 ± 1,97 ^a | 26,94 ± 1,22 ^b | 79,71 ± 1,54 ^c |
| Antocianinas poliméricas (%) | 8,66 ± 0,26 ^a | 8,45 ± 0,31 ^a | 10,63 ± 0,4 ^b |

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas (P < 0,05).

En la comparación de las eficiencias de extracción de los métodos no convencionales (EAM y EFS) con la extracción con solventes (ES), se observó que esta última obtuvo el mayor rendimiento en el parámetro cantidad de extracto crudo y fenoles totales. Estos resultados son coherentes si se tiene en cuenta que a menudo se utiliza esta metodología como método de referencia y de comparación, en el desarrollo u optimización de metodologías de extracción de polifenoles y antocianinas [11]. Sin embargo, al evaluar el contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas, los resultados expresaron que la metodología con mayor eficiencia fue EFS, la cual mostró una mayor selectividad en la extracción de compuestos tipo antocianina y es la técnica más inofensiva en la extracción de las fracciones monoméricas y poliméricas en comparación la metodología EAM.

Si bien el contenido de fenoles totales en la metodología EAM es mayor en comparación con la metodología EFS, los resultados en cuanto a la cantidad de antocianinas monoméricas indican que esta metodología genera menor estabilidad en la extracción de estas. Según Kerio y colaboradores [19], la aplicación prolongada de microondas puede conducir a la degradación de los compuestos de interés por el sobrecalentamiento del sistema soluto /solvente, lo que podría explicar lo observado en cuanto al rendimiento del contenido de antocianinas monoméricas. Lo anterior concuerda también con lo observado en la extracción de antocianinas monoméricas de Cassis (*Ribes nigrum* L.) con menores rendimientos de extracción y tiempos exposición prolongados a radiación de microondas [22].

Por otra parte, por el método de extracción-fermentación simultánea se podría obtener antocianinas con mayor grado de pureza en comparación a las extraídas con solventes. Las levaduras durante el proceso de fermentación, además de producir etanol y CO₂ a partir de los azúcares del fruto, también producen alcoholes superiores, éteres etílicos, ácidos grasos y acetatos. Estos metabolitos se pueden combinar con antocianinas y formar piroantocianinas que son más estables que las antocianinas [15], mejorando así la selectividad en los procesos de extracción y mejorando los rendimientos.

El contenido de antocianinas monoméricas totales reportado en el fruto de *Eugenia malaccensis*, obtenidos por el método de EFS cuyos valores son reportados en la tabla 1, que fue la metodología presentó mejores resultados, cuando comparado con otros frutos reportados en la literatura, y obtenidos por la metodología convencional de extracción con solventes, se puede evidenciar que sus valores se encuentran por debajo para el

fruto Açaí de Colombia (*Euterpe oleracea mart*) con un valor de 268,5 mg de cianidina-3-glucósido/100 g de açaí [23]. Sin embargo, el contenido de antocianinas encontrado en fresas del Brasil (*Fragaria x Ananassa*) fue mayor, debido a que este fruto presentó valores de 14,69 mg cianidina-3-glucósido/100 g de fresa [24]. De igual manera, en comparación con frutos como la mora (*Morusnigra*), uva (*Vitisvinifera*) y berenjena lila (*Solana melonera L.*); el fruto de *Eugenia malaccensis* presentó también un contenido mayor de antocianinas monoméricas con valores reportados de: 41,48; 30,9 y 2,78 mg cianidina-3-glucósido/100 g de fruto, respectivamente [25,26]. Estos resultados indican que el fruto de *Eugenia malaccensis* se ubica entre las fuentes de uso común, con contenidos aceptables de compuestos antocianínicos, que pueden ser extraídos utilizando EFS. Esta metodología presenta ventajas como mayor eficiencia de extracción de los metabolitos de interés y menor gasto de solventes, colocando al método en ventaja sobre metodologías convencionales, y generando así un enorme potencial sobre su aprovechamiento agroindustrial.

Análisis HPLC-ESI-MS de las antocianinas monoméricas

Debido a que los métodos de extracción propuestos no son selectivos para la obtención únicamente de antocianinas, se implementó la técnica de purificación mencionada anteriormente. La muestra aislada por EFS se cargó a la columna de Amberlita XAD-7, la cual retiene compuestos polifenólicos (antociainas) y eluyen otros componentes (azúcares, ácidos fenólicos, etc) que no son de interés en esta investigación, aislando finalmente un extracto rico en antocianinas (ERA). Una vez eliminado el solvente, las antocianinas se analizaron por HPLC-DAD y por HPLC-ESI-MS.

En la figura 1 se muestra el perfil HPLC-DAD registrado para ERA. En éste se observan fundamentalmente tres señales principales, que comparadas con la literatura, pueden corresponder a las antocianinas mayoritarias presentes en el extracto analizado, compuestos a, b y c. El análisis por HPLC-ESI-MS permitió obtener los espectros de masas para cada compuesto (figura 2). La identificación se realizó comparando su tiempo de retención y peso molecular con los datos de la literatura [16].

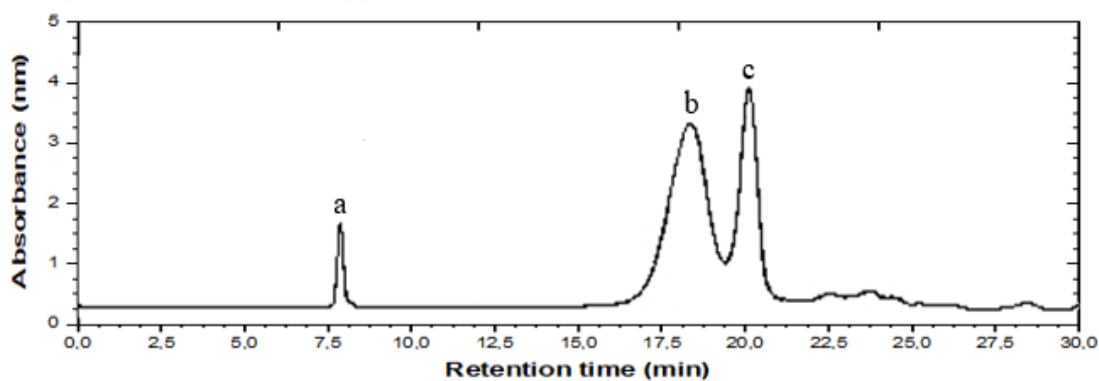


Fig. 1. Perfil cromatográfico HPLC-DAD obtenido para el extracto rico en antocianinas monoméricas (ERA)

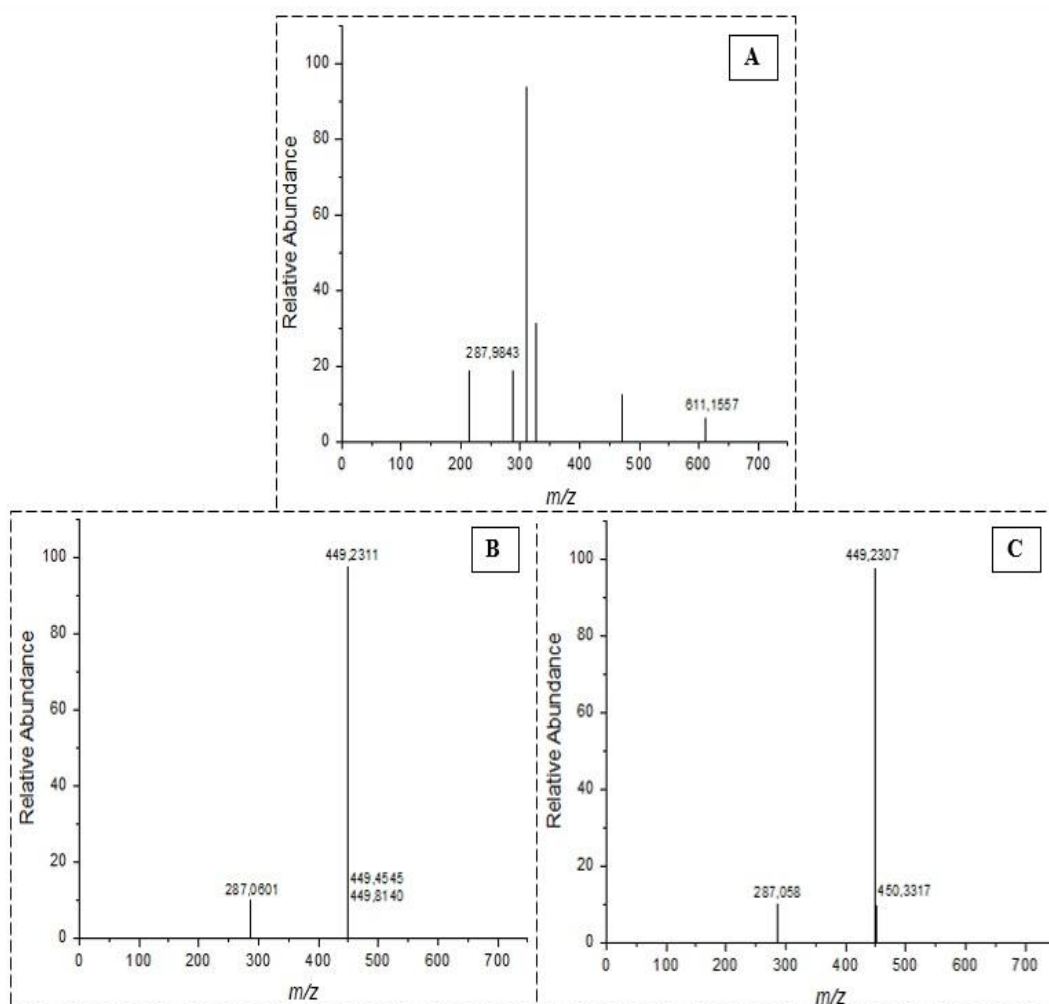


Fig. 2. Espectros de masas en modo positivo de las antocianinas mayoritarias del ERA aislado del fruto de *Eugenia malaccensis*: (A) compuesto a, (B) compuesto b, (C) compuesto c

Para el compuesto (a) se encontró un máximo de absorción en 518 nm, que es característico de las antocianinas. Adicionalmente el espectro de masas (figura 2A) de este compuesto muestra un ión pseudomolecular m/z 611, que corresponde a la cianidina-di-hexosido. Además, de la presencia de la agliconacianidina por el ion

fragmento m/z 287, que se puede fragmentar debido a la pérdida de dos hexosas, glucosa y/o galactosa $[M+H-162-162]$. Estos resultados fueron comparados con otros estudios como Ammar y colaboradores [25] y Hao y colaboradores [26] que encontraron patrones de fragmentación para este tipo de molécula.

En la figura 2B se muestra el espectro de masas para la señal cromatográfica “b” (figura 1). Este compuesto presentó un máximo de absorción en 517 nm y en el espectro de masas (figura 2b) se observó una señal con una relación m/z de 449, característica del ión pseudomolecular $[M+H]^+$. Este ion está en concordancia con la masa de la cianidina-3-hexosido. El ion fragmento m/z 287 podría corresponder a una unidad de cianidina que se genera por la pérdida de una unidad de azúcar de 162 una $[M+H-162]^+$ [27].

Finalmente, para el compuesto (c) con un máximo de absorción en 517 nm, el espectro de masas (Figura 2C) muestra un ión pseudomolecular igual al obtenido para el compuesto (b) (m/z 449). Por su ion fragmento m/z 287 este compuesto también tiene como aglicona la cianidina, la cual se genera por la pérdida de una hexosa (glucosa o galactosa) [27–29].

Dado que los patrones de fragmentación de las señales cromatográficas b y c mostraron un comportamiento semejante, la caracterización de los posibles componentes mayoritarios se complementó teniendo en cuenta los tiempos de retención. Se sabe que las cianidina-3-galactósido y cianidina-3-glucósido eluyen en diferentes tiempos de retención [30]. Debido a que la señal cromatográfica “b” mostró un menor tiempo que la señal cromatográfica “c”, esta última se asignó como posible compuesto a la cianidina-3-galactósido y el compuesto (b) a la cianidina-3-glucósido. Este comportamiento ya se ha observado en otros estudios, en donde reportan el siguiente orden de elusión: galactósido, seguido por glucósido, arabinósido y por último xilósido [30]. Lo anteriormente mencionado también fue observado para la asignación estructural de diferentes cianidinas obtenidas de extractos de maíz morado (*Zea mays L.*) [31] y en diferentes variedades de arándanos [27].

Así, el análisis por HPLC-ESI-MS permitió identificar tres derivados de cianidina: cianidina-di-hexosido, cianidina-3-glucósido y cianidina-3-galactósido. Este tipo de antocianidina es muy común en diferentes frutos de la familia *Mirtaceae* [23,30-33].

Conclusiones

En la comparación de la eficiencia de extracción de los métodos estudiados (ES, EAM y EFS), se observó que la extracción convencional (ES) obtuvo el mayor rendimiento en cuanto a la cantidad de extracto crudo con un valor porcentual de $10,3 \pm 0,6$ y fenoles totales $332,30 \pm 4,48$ medidos en mg de ácido gálico/100 g de fruta. Sin embargo, al evaluar el contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas, los resultados expresaron que la metodología con mayor eficiencia fue la extracción con fermentación simultánea (EFS), la cual mostró una mayor selectividad en la extracción de compuestos tipo antocianina con valores de $79,71 \pm 1,54$ mg de cianidina-3-glucósido /100 g de fruto y $10,63 \pm 0,4$ en porcentaje de color polimérico.

Parámetros que indicaron una mayor selectividad de este método, por lo tanto fue escogido como el más adecuado para la extracción de este tipo de componentes. En el perfil obtenido por HPLC-ESI-MS se evidenció la aparición de tres señales principales, cada una de estas señales fueron analizadas de manera individual mediante espectrometría de masas, encontrándose como posibles compuestos mayoritarios: cianidina-di-hexosido, cianidina-3-glucósido y cianidina-3-galactósido.

Referencias bibliográficas

1. NICÁCIO AE; ROTTA EM; BOEING JS; BARIZÃO ÉO; KIMURA E; VISENTAINER JV; et al. "Antioxidant Activity and Determination of Phenolic Compounds from *Eugenia involucrata* DC. Fruits by UHPLC-MS/MS". *Food Anal Methods*. 2017, **10**, 2718–28. ISSN: 1936-976X.
2. DE SOUZA CARDOSO J; OLIVEIRA PS; BONA NP; VASCONCELLOS FA; BALDISSARELLI J; VIZZOTTO M; et al. "Antioxidant, antihyperglycemic, and antidyslipidemic effects of Brazilian-native fruit extracts in an animal model of insulin resistance". *Redox Rep*. 2018, **23**, 41–6. ISSN: 1351-0002.
3. DE FIGUEIRÔA E; NASCIMENTO L; LAGOS C; DE ANDRADE J; DA SILVA N; ALVES V; et al. "Evaluation of Antioxidant, Immunomodulatory, and Cytotoxic Action of Fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.: Correlation with Polyphenol and Flavanoid Content". *Sci World J*. 2013, **7**, 1–7. ISSN: 1537-744X.

4. BATISTA ÂG; DA SILVA JK; BETIM CAZARIN CB; BIASOTO ACT; SAWAYA ACHF, PRADO MA; et al. "Red-jambo (*Syzygium malaccense*): Bioactive compounds in fruits and leaves". *LWT - Food Sci Technol*: 2017, **76**, 284–91. ISSN: 0023-6438.
5. ROOSITA K; KUSHARTO CM; SEKIYAMA M; FACHRUROZI Y; OHTSUKA R. "Medicinal plants used by the villagers of a Sundanese community in West Java, Indonesia". *J Ethnopharmacol*. 2008, **115**, 72–81. ISSN: 0378-8741.
6. VIEGAS T; DUARTE M; MONTEIRO M; PEGADO W; MATA A. "Determinação simultânea de antocianinas e compostos fenólicos totais em frutos intactos de jambo (*eugenia malaccensis*) empregando a espectroscopia no infravermelho próximo (nir) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS2)". *Blucher Chem Eng Proc*. 2015, **1**:1–7. ISSN: 2359-1757.
7. SUI X; YAP PY; ZHOU W. "Anthocyanins During Baking: Their Degradation Kinetics and Impacts on Color and Antioxidant Capacity of Bread". *Food Bioprocess Technol* 2015, **8**, 983–94. ISSN: 1935-5149.
8. MARTINS N; RORIZ CL; MORALES P; BARROS L; FERREIRA ICFR. "Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices". *Trends Food Sci Technol*. 2016, **52**, 1–15. ISSN: 0924-2244 .
- 9 RODRIGUEZ-AMAYA DB. Natural food pigments and Colorants. In: Mérillon J-M; Ramawat KG. (Eds) editors. *Bioactive Molecules in Food*, Cham: Springer International Publishing, 2017, pp. 1–35. ISSN: 978-3-319-54528-8.
10. BURSAC KOVAČEVIĆ D; PUTNIK P; DRAGOVIĆ-UZELAC V; PEDISIĆ S; REŽEK JAMBRAK A; HERCEG Z. "Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice". *Food Chem*. 2016, **190**, 317–23. ISSN: 03088146.
- 11 CAI Z; QU Z; LAN Y; ZHAO S; MA X, WAN Q; et al. "Conventional, ultrasound-assisted, and accelerated-solvent extractions of anthocyanins from purple sweet potatoes. *Food Chem* 2016;197:266–72. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.110>.

12. MANE S; BREMNER DH; TZIBOULA-CLARKE A; LEMOS MA. Effect of ultrasound on the extraction of total anthocyanins from Purple Majesty potato". *Ultrason Sonochem.* 2015, **27**, 509–14. ISSN: 1350-4177.
13. DIAZ JT; CHINN MS; TRUONG V-D. "Simultaneous saccharification and fermentation of industrial sweetpotatoes for ethanol production and anthocyanins extraction". *Ind Crops Prod.* 2014 **62**, 53–60. ISSN: 0926-6690.
14. WEN Y; CHEN H; ZHOU X; DENG Q; ZHAO Y; ZHAO C; et al. "Optimization of the microwave-assisted extraction and antioxidant activities of anthocyanins from blackberry using a response surface methodology". *RSC Adv.* 2015, **5**, 19686–95. ISSN 2046-2069.
15. FAN G; HAN Y; GU Z; GU F. "Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato culture". *LWT - Food Sci Technol.* 2008, **41**, 1412–6. ISSN 0023-6438.
16. YANG Z, ZHAI W. "Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS". *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2010, **11**, 470–6. ISSN:1466-8564.
17. HE B; ZHANG L-L; YUE X-Y; LIANG J; JIANG J; GAO X-L; et al. "Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace". *Food Chem*; 2016, **204**, 70–6. ISSN:0308-8146.
18. LOTFI L; KALBASI-ASHTARI A; HAMED I M; GHORBANI F. "Effects of sulfur water extraction on anthocyanins properties of tepals in flower of saffron (*Crocus sativus* L)". *J Food Sci Technol.* 2015, **52**, 813–21. ISSN:0975-8402.
19. KERIO LC; WACHIRA FN; WANYOKO JK; ROTICH MK. "Characterization of anthocyanins in Kenyan teas: Extraction and identification". *Food Chem.* 2012, **131**, 31–8. ISSN: 0308-8146.
20. REQUE PM; STEFFENS RS; JABLONSKI A; FLÔRES SH; RIOS ADO; DE JONG E V. "Cold storage of blueberry (*Vaccinium* spp.) fruits and juice: Anthocyanin stability and antioxidant activity". *J Food Compos Anal* 2014, **33**, 111–6. ISSN: 0889-1575.

21. WEST ME; MAUER LJ. "Color and chemical stability of a variety of anthocyanins and ascorbic acid in Solution and powder forms". *J Agric Food Chem.* 2013, **61**, 4169–79. ISSN:0021-8561.
22. PAP N; BESZÉDES S; PONGRÁCZ E; MYLLYKOSKI L; GÁBOR M; GYIMES E; et al. "Microwave-Assisted Extraction of Anthocyanins from Black Currant Marc". *Food Bioprocess Technol.* 2013, **6**, 2666–74. ISSN:1935-5149.
23. ROJANO BA; ZAPATA I; ALZATE A; MOSQUERA A; CORTÉS F; GAMBOA L. "Polifenoles y Actividad Antioxidante del Fruto Liofilizado de Palma Naidi (Açaí Colombiano) (*Euterpe oleracea* Mart)". *Rev Fac Nac Agron Medellín.* 2011, **64**, 6213–20. ISSN: 2248-7026.
24. DE SOUZA VR; PEREIRA PAP; DA SILVA TLT; DE OLIVEIRA LIMA LC; PIO R; QUEIROZ F. "Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits". *Food Chem.* 2014, **156**, 362–8. ISSN: 0308-8146.
25. KUSKOSKI EM; ASUERO AG; TRONCOSO AM; MANCINI-FILHO J; FETT R. "Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos". *Food Sci Technol*, 2005, **25**, 726–32. ISSN: 1678-457X.
26. HERAS I; ALVIS A; ARRAZOLA G. "Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (*Solana melonera* L.)". *Inf Tecnológica.* 2013, **24**, 93–102. ISSN:0718-0764.
27. AMMAR S; DEL MAR CONTRERAS M; BELGUITH-HADRICH O; SEGURA-CARRETERO A; BOUAZIZ M. "Assessment of the distribution of phenolic compounds and contribution to the antioxidant activity in Tunisian fig leaves, fruits, skins and pulps using mass spectrometry-based analysis". *Food Funct* 2015, **6**, 3663–77. ISSN:2042-6496.
28. HAO J; ZHU H; ZHANG Z; YANG S; LI H. "Identification of anthocyanins in black rice (*Oryza sativa* L.) by UPLC/Q-TOF-MS and their in vitro and in vivo antioxidant activities". *J Cereal Sci.* 2015, **64**, 92–9. ISSN:0733-5210.
29. LI D; MENG X; LI B. "Profiling of anthocyanins from blueberries produced in China using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis". *J Food Compos Anal.* 2016, **47**, 1–7. ISSN:0889-1575.

30. CAO S-Q; PAN S-Y; YAO X-L; FU H-F. "Isolation and Purification of Anthocyanins from Blood Oranges by Column Chromatography". *Agric Sci China*. 2010, **9**, 207–15. ISSN:1671-2927.
31. HUANG Z; WANG B; WILLIAMS P; PACE RD. "Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS". *LWT - Food Sci Technol*. 2009, **42**, 819–24. ISSN:0023-6438.
32. FLORES G; DASTMALCHI K; PAULINO S.;WHALEN K;DABO AJ; REYNERTSON KA; et al. "Anthocyanins from *Eugenia brasiliensis* edible fruits as potential therapeutics for COPD treatment". *Food Chem*. 2012, **134**, 1256–62. ISSN:0308-8146.
33. LAO F; GIUSTI MM. "Quantification of Purple Corn (*Zea mays* L.) Anthocyanins Using Spectrophotometric and HPLC Approaches: Method Comparison and Correlation". *Food Anal Methods*.2016, **9**, 1367–80. ISSN: 1936-976X.
34. GOUVÊA AC; MELO A; SANTIAGO M; PEIXOTO F; FREITAS V; GODOY R; et al. "Identification and quantification of anthocyanins in fruits from *Neomitrantes obscura* (DC.) N. Silveira an endemic specie from Brazil by comparison of chromatographic methodologies". *Food Chem*.2015, **185**, 277–83. ISSN: 0308-8146.
35. LOWRY JB. "Anthocyanins of the Melastomataceae, Myrtaceae and some allied families". *Phytochemistry*. 1976, **15**, 513-516. ISSN:0031-9422.