

ANÁLISIS PRELIMINAR DE ANTOCIANINAS EN FRUTO DE ICACO (*Chrysobalanus icaco* L.)

PRELIMINAR ANALYSIS OF ANTHOCYANINS OF THE COCOPLUM FRUIT (*Chrysobalanus icaco* L.)

Georgina Vargas-Simón^{1, 2*}, Ramón Marcos Soto-Hernández² y María Teresa Rodríguez-González²

¹ Programa de Fisiología Vegetal y Programa en Botánica, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad e Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados. Km. 36.5 Carr. México-Texcoco. C.P. 56230. Montecillo, Estado de México. ² Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Km. 0.5 Carr. Villahermosa-Cárdenas. C.P. 86000. Villahermosa, Tabasco, México. Fax: 01 (993) 354-4308. Correo electrónico: gvargas@portium.com.mx

* Autor responsable

RESUMEN

El icaco (*Chrysobalanus icaco* L.) es una planta nativa, poco domesticada de América y África, distribuida en algunas zonas tropicales del mundo; sus usos son como alimento, medicinal y ornamental, principalmente. Sus frutos se caracterizan por tener diferencias morfológicas, particularmente en la pigmentación debida a la presencia de antocianinas. La identificación de estos compuestos serviría de base para estudios posteriores en el área quimiotaxonómica, ecológica y fisiológica. Por medio de técnicas cromatográficas en papel descendente y espectrales, se identificaron de forma cualitativa las antocianinas de los exocarpos de frutos rojos como cianidina 3-arabinósido y a la delfinidina 3,5-diglucósido en los de frutos morados, por comparación con estándares obtenidos de fuentes conocidas.

Palabras clave: Frutos, cromatografía, espectrofotometría, cianidina, delfinidina.

SUMMARY

The cocoplum (*Chrysobalanus icaco* L.) is a barely domesticated native plant from America and Africa; its is distributed in some of the world's humid tropics. Its main uses are as a food, medicine and ornamental. The fruits have morphological differences, particularly in pigmentation, due to the presence of anthocyanins. The identification of these substances may serve as a starting point for further studies in chemotaxonomy, ecology and physiology. Through chromatographic on descendent paper and spectrophotometric techniques, it was identified in a qualitative way the anthocyanins of the skin of red and purple fruits, as cyanidin 3-arabinoside and delphinidin 3,5 diglucoside, respectively, in comparison with standards.

Index words: Fruits, chromatography, spectrophotometry, cyanidin, delphinidin.

INTRODUCCIÓN

Las antocianinas son el grupo más importante de pigmentos que se hallan en las células epidermales o subepidermales de la planta, principalmente en flores y frutos. En la naturaleza, éstos juegan un papel definitivo en la atracción de animales como factores de polinización y dis-

persión de semillas; su presencia en partes diferentes a las flores, sirve posiblemente en la percepción o filtración de luz y respuesta a los factores de estrés, como el ataque microbiano. Se relacionan además con la resistencia contra plagas (Gross, 1987; Harborne, 1991; Markham, 1982; Strack y Wray, 1994).

Para la industria, las antocianinas tienen un potencial considerable en la rama alimentaria como aditivo, por su carácter inocuo (Strack y Wray, 1994).

En la identificación de estos pigmentos ha sido relevante la quimiotaxonomía, ya que provee marcadores útiles para diferenciar especies a niveles familiares y genéricos. En la familia Rosaceae, cincuenta especies del género *Malus* contienen el mismo pigmento, cianidina 3-galactósido, el cual no se encuentra en otras especies. En la familia Vitaceae, la especie *Vitis vinifera* puede ser distinguible de los híbridos por la ausencia de antocianinas de naturaleza diglucósida; el análisis puede realizarse tanto en las bayas como en el vino (Gross, 1987; Singah *et al.*, 1991; Swain, 1985; Ribéreau-Gayon, 1964).

En los frutos, las antocianinas se localizan preferentemente en la cáscara y ocasionalmente en la pulpa y pueden contener un solo tipo de pigmento, como en la manzana (*Pyrus malus*) y la grosella roja (*Ribes rubrum*), las cuales contienen únicamente cianidina. En cambio, frutos como la uva (*V. vinifera*) y los arándanos (*Vaccinium myrtillus*) contienen la combinación de cinco de las seis antocianinas comunes. La variación de antocianinas en frutos es más limitada que en flores, donde se han registrado 50 diferentes, de las cuales la cianidina es la más común, y siguen en orden de importancia, peonidina, delfinidina, pelargonidina, malvidina y petunidina (Gross, 1987; Macheix *et al.*, 1990; Van Buren, 1970).

Las moléculas de antocianinas se hallan como glucósidos, lo que les confiere una alta solubilidad en agua y una relativa estabilidad; dentro de los azúcares más comunes se han determinado a glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa y xilosa. En los frutos comunes casi todos los glucósidos tienen azúcares ligados a la posición 3 del aglicón (Gross, 1987; Harborne, 1984; Strack y Wray, 1994; Valencia, 1995).

La cantidad y calidad de antocianinas en los frutos dependerá de su fase de desarrollo. En especies como manzana, pera (*Pyrus communis*) y vid se ha observado que la producción de estos pigmentos puede ocurrir cuando el fruto aún es muy joven o cuando la división celular ha concluido, y que se logra una concentración relevante cuando el fruto alcanza su maduración (Sakuta *et al.*, 1994; Viljoen y Huysamer, 1995). En frutos como fresa (*Fragaria vesca*) y grosella, la cantidad de antocianinas es invariable tanto en frutos inmaduros como en los maduros (Toldam-Andersen y Hansen, 1997).

Para la extracción de estos pigmentos se ha utilizado la maceración del tejido en ácido fórmico-metanol 2 a 10 %, ácido clorhídrico 1 a 3 % o ácido trifluoro acético-metanol 0.5 a 3 % (Harborne, 1991; Macheix *et al.*, 1990; Strack y Wray, 1994).

El color y comportamiento en las cromatografías (polaridad) proporcionan datos relevantes para su separación e identificación (valores de R_f). De las técnicas fitoquímicas, como las cromatografías en papel (CP), capa fina (CCP), columna (CC) y gas líquido (CGL), la más común es la CP-descendente por ser un método de bajo costo y práctico que utiliza eluyentes como BAW (*n*-butanol-ácido acético glacial-agua, 4:1:5), BuHCl (*n*-butanol-ácido clorhídrico 2N, 1:1, fase superior), Forestal (ácido clorhídrico concentrado-ácido acético glacial-agua, 3:30:10), HCl 1 % (ácido clorhídrico concentrado-agua, 3:97) y Fórmico (ácido clorhídrico concentrado-ácido fórmico-agua, 2:5:3); la utilización de varios disolventes ofrece mejores resultados comparativos (Francis, 1982; Gross, 1987; Harborne, 1967; Harborne *et al.*, 1973; Tanchev y Timberlake, 1969).

Para complementar la identificación, existen técnicas físicas como la espectrofotometría de UV/VIS, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); y otras menos usadas como polarografía y ESR (Electron Spin Resonance) (Strack y Wray, 1989; Takeda *et al.*, 1994).

Dada la importancia de estos pigmentos desde el punto de vista fisiológico, taxonómico y económico, se elaboró este trabajo en una especie del trópico húmedo, el icaco

(*Chrysobalanus icaco* L.) con el objeto de extraer, separar e identificar cualitativamente las antocianinas presentes en los exocarpos de dos tipos de frutos: rojos y morados. Los resultados obtenidos podrían marcar diferencias químicas y servirían de base para realizar estudios posteriores de tipo quimiotaxonómicos, ecológicos y fisiológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Colecta de frutos (*Chrysobalanus icaco*). Los frutos rojos y morados se colectaron en una población silvestre ubicada en Paraíso, Tabasco, México (18° 24.6' LN y a 93° 10.7' LO al nivel del mar), en enero de 1997. Se seleccionaron frutos maduros, con coloración rojiza y morada uniforme en la cáscara. Un ciento de frutos de cada color se llevaron al Laboratorio de Fitoquímica (Colegio de Postgraduados) en donde se pelaron y los exocarpos se congelaron en nitrógeno líquido para su liofilización; después se almacenaron en refrigeración a 4 °C durante 10 días para su posterior análisis.

2) Estándares. Los estándares de las seis antocianinas se obtuvieron de la cáscara de: manzana roja 'Washington rome' (*Pyrus malus*), pétalos de "aretillo" (*Fuchsia hybrida*), pétalos de petunia (*Petunia* sp), pétalos de malvón (*Pelargonium zonale*), cáscara de mango 'Haden' (*Mangifera indica*), y de cáscara de berenjena (*Solanum melongena*). Estos materiales sirvieron para obtener cianidina 3-arabinosido, malvidina 3,5 diglucósido, petunidina 3-sophorosido, pelargonidina 3,5 diglucósido, peonidina 3-galactósido y delfinidina 3,5 diglucósido, respectivamente. El criterio de selección fue que las fuentes tuvieran un solo aglicón y se corroboró la presencia de dichas antocianinas con revisión bibliográfica y mediante análisis previos realizados en el laboratorio por las mismas técnicas fitoquímicas que aquí se describen (Dick *et al.*, 1987; Harborne, 1967; Harborne *et al.*, 1973; Harborne, 1984; Hattori, 1962; Macheix *et al.*, 1990; Proctor y Creasy, 1969).

3) Extracción. Para la extracción de las antocianinas de los frutos de icaco y de los estándares se utilizó la técnica sugerida por Strack y Wray (1994). Los materiales finamente picados se colocaron en matraces Erlenmeyer con ácido trifluoro acético-metanol 3 % por 24 horas; los pesos de cada material fueron variables en cada caso. La solución filtrada de cada producto se llevó a sequedad en un rotavapor a 50 °C (Büchi R-114, baño B-480 con bomba de vacío Cole Parmer Modelo 7049-50); el residuo se pasó por una corriente de nitrógeno para obtener el extracto crudo.

4) Separación e identificación. Se realizó por medio de cromatografía en papel (CP) descendente con dos repeticiones, y con espectrofotometría UV/VIS. Para la

cromatografía se utilizó papel Whatman # 3, en hojas de 46 x 57 cm; las muestras se aplicaron en bandas de 2.5 cm de longitud y 1.5 de separación entre cada una, a una dosis de 4 mL de extracto crudo por banda (cada banda correspondió a los 6 estándares y los 2 tipos de frutos). La distancia de elución fue de 35 cm, y se colocaron en una cámara de cromatografía Chromatocab Mod. A-300, Ser. 5169, de 83 x 85 x 65 cm (L x A x P). Los eluyentes utilizados fueron: BAW (*n*-butanol-ácido acético glacial-agua, 4:1:5), BuHCl (*n*-butanol- ácido clorhídrico 2 N, 1:1, fase superior), HOAc-HCl (agua-ácido acético glacial-12 N ácido clorhídrico, 82-15-3) y HCl 1 % (ácido clorhídrico concentrado-agua, 3:97) (Harborne, 1967; 1984; Markham, 1982).

Los valores espectrales se obtuvieron con el recorte de cada banda pigmentada, diluidas en metanol acidificado (0.01 % de HCl), y se leyeron en dos espectrofotómetros: UV SP8-100 PYE UNICAM y en el UV/VIS Perkin Elmer LAMBDA 2, en el rango de 300 a 600 nm.

Los valores de R_f y espectrales obtenidos en esta investigación fueron comparados con datos de literatura y con los estándares aislados e identificados en el Laboratorio de Fitoquímica de fuentes conocidas (Harborne *et al.*, 1973; 1984; Proctor y Creasy, 1969).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de cuatro eluyentes (BAW, Bu-HCl, HOAc-HCl y HCl 1 %), permitió comparar los diferentes valores de R_f de acuerdo con su polaridad; además, se ha determinado que son particularmente especiales para la separación de glucósidos de antocianinas (Barrit y Torre, 1975; Francis, 1982; Gross, 1987; Harborne, 1967; Harborne *et al.*, 1973; Tanchev y Timberlake, 1969). Los frutos de icaco morado presentaron tres bandas (Cuadro 1), que de acuerdo con sus valores de R_f y espectrales, la banda 1 se identificó como delfinidina 3,5 diglucósido. Datos similares se obtuvieron en la banda 1 de *Solanum melongena* (Cuadro 1) y los registrados en la literatura, en donde se menciona que este compuesto se caracteriza por tener valores de R_f de 15, 3, 32, 8 (para los eluyentes antes mencionados) y longitudes máximas de 546, 553 nm (datos de delfinidina sin especificar fuente y de *Verbena hybrida*, respectivamente) (Francis, 1982; Harborne, 1967; Seikel, 1962).

En la banda 2 identificada en icaco morado (Cuadro 1), la antocianina podría corresponder a otro glucósido de la misma, delfinidina 3-rutinosido, cuyos valores de R_f son: 30, 15, 37 y 11 (mismos eluyentes) y una longitud máxima de 534 nm (Harborne, 1967); sólo los primeros valores de R_f y espectrales son similares por los obtenidos en *Solanum*

tuberosum (Harborne, 1967). La tercera banda no aportó cifras completas para poderse identificar.

Cuadro 1. Valores de R_f y espectrales para antocianinas de *Chrysobalanus icaco* y estándares^{+,++}.

Especie	R_f (x 100) ⁺⁺⁺				$\lambda_{\text{MeOH}}^{\text{máx}}$ (nm)
	BAW	BuHCl HCl	HOAc- HCl	1 %	
<i>Fuchsia sp.</i>	28	9	48	22	526
<i>Petunia sp.</i>	23	6	24	9	529
	33	14	53	35	530
<i>Pelargonium zonale</i>	17	6	-	18	531
	27	6	48	24	511
<i>Chrysobalanus icaco</i> (morado)	27	6	23	7	543
	37	22	54	32	536
	69	40	-	-	531
<i>Chrysobalanus icaco</i> (rojo)	28	12	6	3	537
<i>Malus pumila</i>	45	28	24	7	526
<i>Mangifera indica</i>	40	22	18	2	523
<i>Solanum melongena</i>	12	9	26	10	541
	28	20	-	27	542

⁺Promedio de dos repeticiones.

⁺⁺Los números en negritas indican los valores comparables entre *Chrysobalanus icaco* y los estándares.

⁺⁺⁺ Distancia de elución: 35 cm

Al respecto, Macheix *et al.* (1990) mencionan que las antocianinas se pueden agrupar en antocianinas mayoritarias y antocianinas minoritarias, el primer grupo representa 90 % de los pigmentos, y los demás están presentes en cantidades muy pequeñas.

Los frutos de icaco rojo se identificaron como cianidina 3-arabinósido, cuyos valores de R_f en la literatura son de: 42, 32, 27, 5 (mismos eluyentes), obtenidos de las hojas de *Theobroma cacao*. No se tienen registros del valor espectral para esta antocianina; sin embargo para cianidina 3-galactósido y cianidina 3-glucósido, son de 526 y de 523 nm (Harborne, 1967), así como de 531 y 535 nm (Salinas *et al.*, 1999).

La presencia del color rojo en los frutos de icaco concuerda con Macheix *et al.* (1990), quienes afirman que la cianidina es la antocianina presente en la mayoría de los frutos rojos (examen realizado en 44 especies pertenecientes a 25 familias). Es un pigmento característico de la familia Rosaceae, grupo botánico en el que estuvo clasificado *Chrysobalanus*.

Los datos aquí obtenidos indican diferencias químicas en los frutos, lo que podría representar un patrón taxonómico a considerar (Prance, 1970; White, 1976). Cabe resaltar además que en lo concerniente a los colores diferentes del mesocarpo, esto podría obedecer a una variación en la síntesis de dichos metabolitos característicos y probablemente dicha propiedad sea controlada por genes, como en el caso de *Solanum melongena*, en donde el color es determinado por nueve genes (Tigchelaar *et al.*, 1968).

En la literatura, los datos de R_f y espectrales corresponden a especies vegetales que en la mayoría de los casos no especifican la variedad que utilizaron para obtener dichos valores. En algunas ocasiones no se encontraron datos precisos sobre la misma especie y los extractos realizados en este trabajo, porque esas fuentes no crecen en el país o porque no se encontró la referencia completa, por lo que se hicieron las comparaciones sobre los glucósidos de los cuales se sospechaba su presencia de acuerdo a la fuente utilizada.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los valores de R_f y espectrales obtenidos de los estándares y del fruto de icaco, se concluye que el exocarpo del fruto morado de icaco contiene delphinidina 3-5 diglucósido, y que el icaco rojo contiene cianidina 3-arabinósido. La diferencia en la pigmentación de los exocarpos de los frutos sería el resultado de una diferencia química en estos flavonoides.

BIBLIOGRAFÍA

- Barrit B H, L C Torre (1975) Fruit anthocyanin pigments of red raspberry cultivars. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 100: 98-100.
- Dick A J, P R Redden, A C DeMarco, P D Lidster, T B Grindley (1987) Flavonoid glycosides of spartan apple peel. J. Agric. Food Chem. 35: 529-531.
- Francis F J (1982) Analysis of anthocyanins. In: Anthocyanins as Food Colors. P Markakis (ed). Academic Press. New York, USA. pp: 181-197.
- Gross J (1987) Pigments in Fruits. Academic Press. Oxford, UK. pp: 59-85.
- Harborne J B (1967) Comparative Biochemistry of the Flavonoids. Academic Press. London, UK. pp: 1-35.
- Harborne J B, T J Mabry, H Mabry (1973) The Flavonoids Part 1. Academic Press. New York, USA. pp: 230-266.
- Harborne J B (1984) Phytochemical Methods. Chapman and Hall. London, UK. pp: 33-99.
- Harborne J B (1991) Flavonoid pigments. In: Herbivorous: their Interaction with Secondary Plant Metabolites. G A Rosenthal, A H Janzen (eds). Academic Press. New York, USA. pp: 389-429.
- Hattori S (1962) Glycosides of flavones and flavonols In: The Chemistry of Flavonoid Compounds. T A Geissman (ed). The Macmillan Company. New York, USA. pp: 317-351.
- Macheix J J, A Fleuriot, J Billot (1990) Fruit Phenolics. CRC Press. Florida, USA. pp: 1-17, 39-81, 105-149.
- Markham K R (1982) Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press, London, UK. pp: 1-112.
- Prance G T (1970) The genera of *Chrysobalanus* in the Southeastern United States. J. Arnold Arboretum Harvard University 51: 521-528.
- Proctor J T, LL Creasy (1969) The anthocyanin of the mango fruit. Phytochemistry 8: 2108.
- Ribéreau-Gayon P (1964) Les composés phénoliques du raisin et du vin. Annales de Physiologie Végétale 6: 211-242.
- Sakuta M, H Hirano, K Kakegawa, J Suda, M Hirose, R W Joy, M Sugiyama, A Komamine (1994). Regulatory mechanisms of biosynthesis of betacyanin and anthocyanin in relation to cell division activity in suspension cultures. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 38:167-169.
- Salinas M Y, M R Soto H, F Martínez B, V González H, R Ortega P (1999) Análisis de antocianinas en maíces de grano azul y rojo provenientes de cuatro razas. Rev. Fitotec. Mex. 22:161-174.
- Seikel M K (1962) Chromatographic methods of separation, isolation and identification of flavonoid compounds In: The Chemistry of Flavonoid Compounds, T A Geissman (ed). The Macmillan Company. New York, USA. pp: 35-69.
- Singh S, T A Baugher, E C Townsend, M C D'Souza (1991) Anthocyanin distribution in 'Delicious' apples and the relationship between anthocyanin concentration and chromaticity values. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 116: 497-499.
- Strack D, V Wray (1989) Anthocyanins glycosides: In: Methods in Plant Biochemistry Vol. I. Plant Phenolics. J B Harborne (ed). Academic Press. London, UK. pp: 197-234.
- Strack D, V Wray (1994) The anthocyanins In: The Flavonoids. J B Harborne (ed). Chapman & Hall. London, UK. pp: 1-22.
- Swain T (1985) Plant phenolics: Past and future In: Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe. C F Van Sumere, P J Lea (eds). Vol. 25. Clarendon Press. Oxford University Press, Oxford, UK. pp: 453-467.
- Takeda K, S Sato, H Kobayashi, Y Kanaitsuma, M Ueno, T Kinoshita, H Tazaki, T Fujimori (1994) The anthocyanin responsible for purplish blue flower colour of *Aconitum chinense*. Phytochemistry 36: 613-616.
- Tanchev, S S, C F Timberlake (1969) The anthocyanins of red cabbage (*Brassica oleracea*). Phytochemistry 8: 1825-1827.
- Tigheelaar E C, J Janick, H T Erickson (1968) The genetics of anthocyanin coloration in eggplant (*Solanum melongena* L.). Genetics 60: 475-491.
- Toldam-Andersen T B, P Hansen (1997) Growth and development in black currant (*Ribes nigrum*) III. Seasonal changes in sugars, organic acids, chlorophyll and anthocyanin and their possible metabolic background. J. Hortic. Sci. 72: 155-169.
- Valencia O C (1995) Fundamentos de Fitoquímica. Ed. Trillas, México. pp: 127-146.
- Van Buren J (1970) Fruit phenolics In: The Biochemistry of Fruits and their Products, A C Hulme. Academic Press. London, UK. pp: 269-303.
- Viljoen M M, M Huysamer (1995) Biochemical and regulatory aspects of anthocyanin synthesis in apples and pears. J. Southern-African Soc. Hortic. Sci. 5:1-6.
- White F (1976) The taxonomy, ecology and chorology of African Chrysobalanaceae (excluding *Acioa*). Bull. Jardin Botanique National de Belgique 46: 265-350.