

## SIGUIENDO LA PISTA

### **Análisis de características diferenciales entre antocianinas y betacianinas en extractos de plantas mediante pruebas de color**

Natalia Martínez Reyes

Estudiante de 4º curso de Biotecnología (curso 2017-2018). Facultad de CC. Biológicas y Ambientales. Universidad de León.

[nmartro5@estudiantes.unileon.es](mailto:nmartro5@estudiantes.unileon.es)

Las antocianinas y las betacianinas son pigmentos rojos y violetas que, además de dar color a las plantas, poseen una importante función antioxidante, y cada vez más aplicaciones en el ámbito alimentario, médico y bioquímico. Estos pigmentos comparten ciertas similitudes, pero también presentan diferencias útiles a la hora de emplearlos en distintas aplicaciones, o de caracterizar plantas. El objetivo de este estudio es realizar pruebas de color sobre extractos crudos que permitan diferenciar entre antocianinas y betacianinas. Se ha observado que las antocianinas cambian su color en función del pH, mientras que las betacianinas vagamente varían su color y se degradan en pH alcalino. Un tratamiento corto a 100°C con HCl también puede degradar las betacianinas, pero no las antocianinas. En metanol ácido, las antocianinas muestran máximos de absorción en el espectro visible más bajos, debido a su viraje hacia tonos rojos. Por último, en cromatografía en papel, y utilizando butanol:acético:agua como fase móvil, las antocianinas pueden separarse y caracterizarse, mientras que las betacianinas apenas migran, pero pueden separarse de las betaxantinas.

**Palabras clave:** antocianidinas, betalainas, cromatografía BAW, pH, pigmentos.

#### **Introducción**

Las antocianinas y las betacianinas son los pigmentos más importantes que contribuyen al color de las flores desde el rojo hasta el violeta. Estos pigmentos pueden acumularse también en hojas, frutos, raíces y otros tejidos de las plantas, y se encuentran principalmente en la epidermis. Cumplen funciones de atracción de animales polinizadores y dispersores de frutos, y protegen frente al daño por radiación ultravioleta al DNA y los fotosistemas, gracias a sus propiedades antioxidantes (Horbowicz *et al.*, 2008).

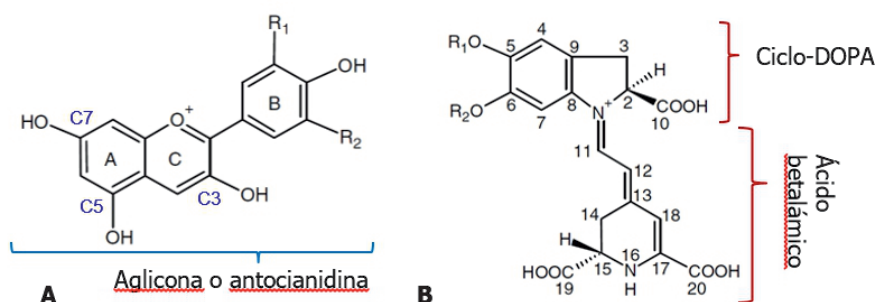
Tanto los atractivos colores, como las propiedades antioxidantes de estos pigmentos han sido aprovechados por los humanos, desde el disfrute de las flores

Forma de mencionar este artículo: Martínez, N. 2018, Análisis de características diferenciales entre antocianinas y betacianinas en extractos de plantas mediante pruebas de color. Ambiociencias 16, 38-48. ISBN: 1998-3021 (edición digital), 2147-8942 (edición impresa). Depósito legal: LE-903-07.

y los frutos, hasta su utilización como pigmentos purificados para una variedad de aplicaciones: colorantes alimentarios, suplementos de antioxidantes, fluoróforos y marcadores biológicos en bioquímica. Como colorantes, poseen propiedades diferenciales útiles para optimizar su utilización, por ejemplo, las betacianinas son más solubles en agua que las antocianinas, pero son menos resistentes al calor que las segundas (Polturak y Aharoni, 2018).

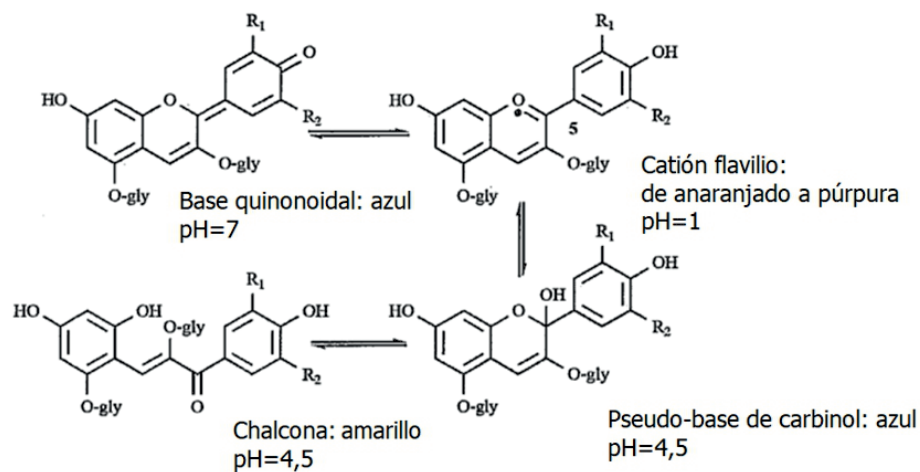
En cuanto a su distribución en la naturaleza, existe un fenómeno de exclusión mutua entre antocianinas y betalaínas, el grupo al que pertenecen las betacianinas. Mientras que las antocianinas están presentes casi globalmente en el reino vegetal, las betacianinas solo se han observado en familias del orden *Caryophyllales*, en las cuales no se han detectado antocianinas (Brockington *et al.*, 2011).

Las antocianinas son flavonoides, y muestran una paleta amplia de colores, desde el anaranjado hasta el azul. Su estructura básica se compone de un anillo benzopirano unido a un segundo anillo aromático llamado B (C6-C3-C6), cuyo conjunto constituye la antocianidina o aglicona (cromóforo) (**Fig. 1**). El color depende principalmente del número de grupos hidroxilo en el anillo B, proporcional al color azulado, mientras que las O-metilaciones lo modifican hacia apariencia rojiza (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Esta aglicona se encuentra O-glicosidada comúnmente en las posiciones C3, C5 y C7, y, a su vez, estos azúcares pueden estar acilados con grupos aromáticos y alifáticos (Tanaka *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Estructura básica de las antocianidinas (A) y betacianinas (B). Modificado de Khan y Giridhar (2015).

El color de las antocianinas también depende del medio en que se encuentren: el pH causa cambios en la estructura de las antocianidinas con gran impacto en el color (**Fig. 2**), y la asociación con otros compuestos sin color (copigmentos), e iones metálicos ( $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ ) modifica el color y la estabilidad (Tanaka *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Representación de los cambios en la estructura y color de una antocianina en función del pH. Modificado de Welch *et al.* (2009).

Las betalainas son pigmentos ricos en nitrógeno derivados del ácido betalámico, procedente de la tirosina. Existen dos categorías de estos pigmentos: betacianinas (entre rojo y violeta) y betaxantinas (amarillas). En las primeras, el ácido betalámico se condensa con ciclo-DOPA, y en las segundas, con distintos aminoácidos. Ambos grupos deben su diversidad a las distintas modificaciones, glicosilaciones y acilaciones, en sus grupos hidroxilo, R1 y R2 en la Figura 1 (Khan y Giridhar, 2015). Las betaxantinas, además, presentan fluorescencia (García Carmona *et al.*, 2011).

Los colores de las antocianinas y las betacianinas en condiciones naturales pueden ser similares, pero sus propiedades físico-químicas no. El objetivo de este trabajo es estudiar estas diferencias. Para ello, se realizaron pruebas sencillas de color y se caracterizaron los pigmentos en extractos crudos de remolacha y de ocho flores de colores morados y rosas, a los que contribuyen principalmente antocianinas y betacianinas. Estas pruebas fueron: comportamiento en pH ácido y alcalino, resistencia a tratamiento con ácido en caliente, espectro de absorbancia en el rango visible y cromatografía en papel.

## Materiales y métodos

### Extracción de los pigmentos con metanol acidificado

Tras la anotación previa de los colores de las muestras originales, se prepararon extractos metanólicos de raíz de remolacha roja (*Beta vulgaris*) y de flores de las siguientes especies: pensamiento (*Viola × wittrockiana*), dalia (*Dhalia* sp.), cactus de Navidad (*Zygocactus truncatus*), rosa (*Rosa* sp.), violeta africana

(*Saintpaulia ionantha*), flor del día (*Mirabilis jalapa*), geranio (*Pelargonium* sp.) y cristalina (*Impatiens balsamina*). Para ello, se homogenizaron las muestras en un mortero con metanol al 80% (v/v) que contenía HCl al 1% (v/v), utilizando el mínimo volumen posible. Tras la maceración, los homogeneizados se filtraron a través de papel de filtro con ayuda de un embudo de filtración y una bomba de vacío, obteniendo el extracto final. El color de dicho extracto se volvió a anotar.

#### Modificación del color en medio básico y estabilidad del color en medio ácido caliente

De cada extracto, se tomó una pequeña alícuota en un tubo de ensayo, diluyéndola con el disolvente de extracción en los casos necesarios. Para comprobar la modificación del color en medio básico, se añadieron unas gotas de NaOH 2M, se agitó la disolución, y se anotó el color. Para comprobar la estabilidad del color en medio ácido caliente, se añadieron unas gotas de HCl 2M a otra alícuota diluida, y se calentaron los tubos a 100°C durante 5 min en un baño de agua hirviendo. Posteriormente, se anotó el color.

#### Determinación del espectro de absorción en el rango visible de los extractos

Los extractos se diluyeron con metanol ácido (dilución 1:4) y se realizó un barrido desde 400 hasta 600 nm en un espectrofotómetro PharmaSpec UV-1700 (Shimadzu).

#### Cromatografía con butanol:acético:agua (BAW)

Se realizó por duplicado una cromatografía ascendente sobre papel Whatman n°1 (20cm x 20cm). Sobre el papel se aplicaron por triplicado 15 µl de cada extracto y de cianidina, secando entre cada aplicación con un secador. Se preparó la cámara cromatográfica con la fase móvil (n-butanol:ácido acético:agua, 8:2:1 vol:vol) y se introdujo el papel en forma cilíndrica, se cerró y se precintó con cinta de carroceros. Se dejó correr hasta que el frente se aproximó al borde superior del papel. Entonces, se extrajo el cromatograma y se dejó secar. Se calcularon los valores de R<sub>f</sub> dividiendo la distancia que había migrado la mancha por la del frente.

### **Resultados y discusión**

#### Color de las muestras previo a la extracción

Los colores de las muestras, antes de ser procesadas, oscilaron entre rosa, morado y granate (**Tabla 1**). Esta observación a simple vista no permite distin-

guir entre antocianinas y betacianinas, ya que estos colores se solapan en la paleta de ambos pigmentos.

Teniendo en cuenta la exclusión mutua entre antocianinas y betalainas, debe notarse que se estudiaron tres representantes del orden *Caryophyllales*: remolacha, cactus de Navidad y flor del día, candidatos a presentar betacianinas.

Cambio del color de los extractos en metanol ácido

Para la extracción, se utilizó metanol acidificado con HCl, dado que un medio ácido favorece la estabilidad de las antocianinas. Precisamente, la acidificación del solvente es la causa de la variación del color nativo de las muestras en los extractos (**Tabla 1**). La mayoría de los extractos en medio ácido viraron al rojo, en general un rojo brillante. La remolacha y el cactus de Navidad cambiaron de un color purpúreo a granate, y la flor del día pasó de presentar un color granate a uno purpúreo.

**Tabla 1.** Colores de las muestras originales, así como de los extractos al ser obtenidos mediante metanol acidificado y al ser tratados con NaOH 2M. Se ilustra el cambio de color de las muestras simulando una escala de pH.

Nombre común	Color del extracto	Color de la muestra	Color en NaOH
Pensamiento	Rojo intenso	Morado intenso	Verde botella
Violeta africana	Rojo magenta	Violeta intenso	Amarillo
Rosa	Rojo piruleta	Púrpura	Verde botella
Geranio	Rojo claro	Morado rosáceo	Amarillo-naranja
Dalia	Rojo piruleta	Rosa	Verde
Cristalina	Rojo	Rosa intenso	Verde oscuro
Remolacha roja	Rojo vino	Morado intenso	Amarillo
Cactus de Navidad	Rojo granate	Granate	Amarillo claro
Flor del día	Morado	Granate	Amarillo

En las antocianinas, el viraje de color causado por descenso de pH se debe al cambio de la estructura de la molécula, que se muestra como catión flavilio (ver **Fig. 2**), con colores entre el rojo y el naranja (Welch *et al.*, 2009). Este fenómeno explica el color rojo brillante que muestran los extractos de pensamiento, dalia, rosa, geranio y cristalina. El extracto de violeta africana no es claramente rojo, pero el cambio de color tiende hacia este tono.

El color de las betacianinas no cambia tanto con el descenso de pH, aunque puede variar ligeramente (Khan y Giridhar, 2015). En los tres miembros del orden *Caryophyllales*, se observa que el cambio en el color tras la extracción no

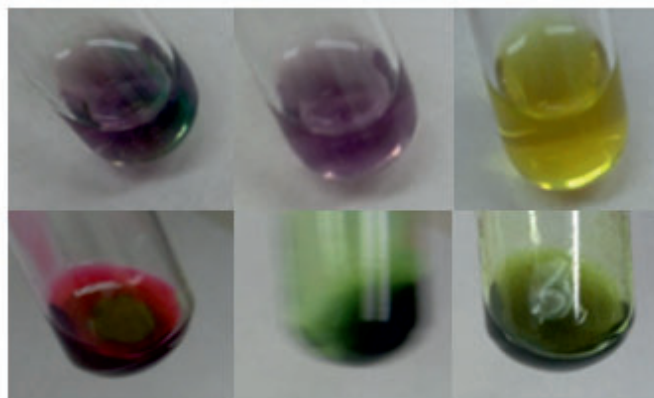
es tan acusado como en el resto de extractos y, además, ninguno se asemeja al rojo brillante, sino que oscilan entre el granate y el morado.

#### Modificación del color en medio básico

Al añadir unas gotas de NaOH 2M a una pequeña alícuota de los extractos, la alcalinidad aumenta fuertemente y los pigmentos viran de color o se degradan (**Tabla 1**).

Los tres extractos de betacianinas: remolacha, cactus de Navidad y flor del día, se tornaron amarillos, color que no muestran los pigmentos en su estado nativo. Puesto que no se han descrito formas químicas intermedias de las betacianinas que expliquen este color, pero sí se ha indicado que su degradación puede dar lugar a compuestos amarillos, como es el ácido betalámico (Khan y Giridhar, 2015), se deduce que el cambio del color de los extractos alcalinizados es consecuencia de la degradación de las betacianinas.

La **Fig. 3** muestra el cambio de color del extracto de violeta africana. Al principio se añadió una gota, observándose una coloración verde que se desvaneció al agitar, y tras añadir varias gotas (nótese el aumento de volumen) adquirió coloración amarilla. Este cambio de color no tiene por qué indicar necesariamente la degradación de las antocianinas (Welch *et al.*, 2008), al contrario de lo que sucedía con las betacianinas. En la **Fig. 3** también se puede observar el cambio de color hacia el verde, en el extracto de rosa, al añadir una gota de NaOH 2M.



**Figura 3.** Viraje del color tras añadir unas gotas de NaOH en el extracto de violeta africana (superior) y de rosa (inferior).

#### Estabilidad del color en medio ácido caliente

Como se observa en la **Tabla 2**, las antocianinas se mantuvieron estables en el medio ácido tras el tratamiento térmico a 100°C durante 5 min, mostrando variaciones ligeras en el tono rojo. En cuanto a las betacianinas, los pigmentos de la remolacha mantuvieron cierta estabilidad, mientras que la coloración de los

extractos de flor del día y cactus de Navidad desapareció, dejando colores amarillentos.

La estabilidad tras este tipo de tratamientos es un aspecto diferencial de relevancia entre las antocianinas y las betalainas: las betalainas son altamente inestables a temperaturas elevadas (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). En el caso de la remolacha roja, la despigmentación parcial puede significar que la concentración de pigmentos era muy elevada, y en el corto tiempo del tratamiento, parte conservaron su estructura.

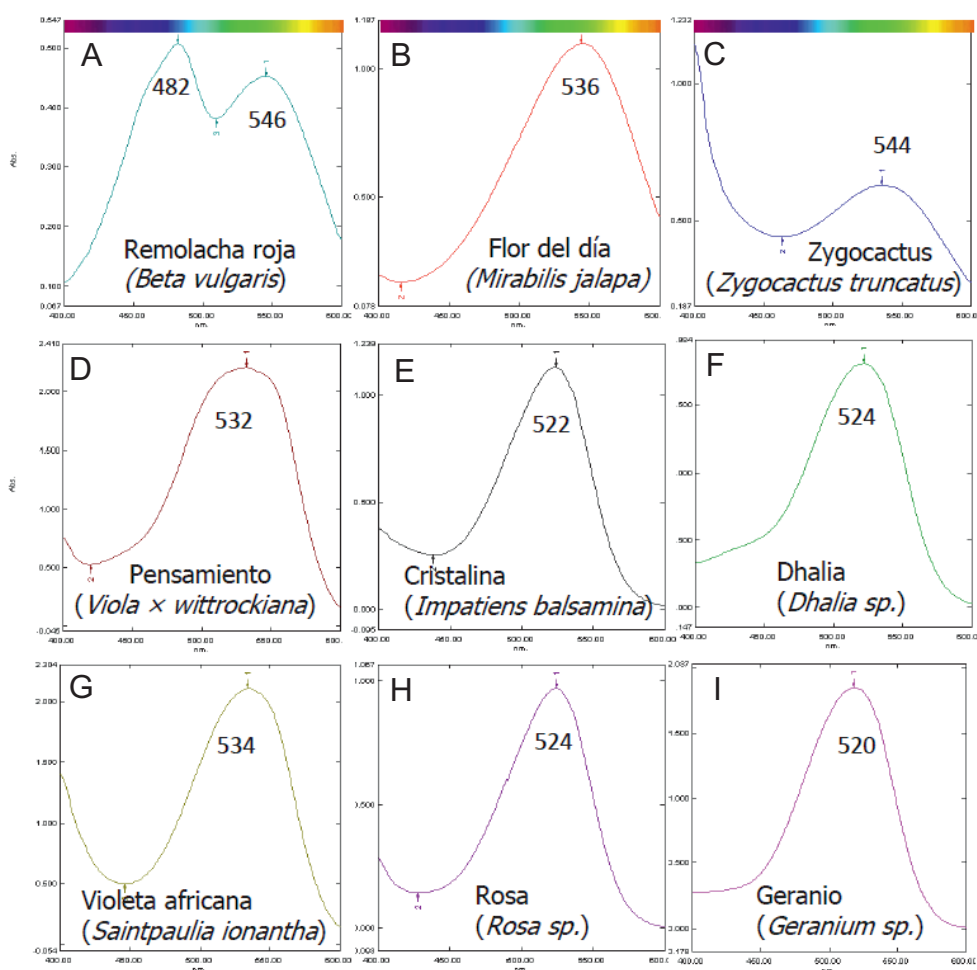
**Tabla 2.** Resultados del tratamiento con ácido caliente sobre los extractos.

Nombre común	Color del extracto	Color en HCl 100°C
Pensamiento	Rojo intenso	Rojo piruleta
Violeta africana	Rojo magenta	Rojo magenta
Rosa	Rojo piruleta	Rojo piruleta
Geranio	Rojo claro	Rojo piruleta
Dalia	Rojo piruleta	Rojo más claro
Cristalina	Rojo	Rojo cereza
Remolacha roja	Rojo vino	Rojo
Cactus de Navidad	Rojo granate	Beige amarillo
Flor del día	Morado	Sepia

#### Determinación del espectro de absorción en el rango visible

Los espectros de absorción de las betacianinas para longitudes de onda ( $\lambda$ ) entre 400 y 600 nm presentaron distintos perfiles, mientras que los de las antocianinas fueron muy similares (**Fig. 4**). El aspecto global a destacar es que los picos de absorción de los extractos de betacianinas se situaron por encima de 536 nm, mientras que los de antocianinas se encontraron en un rango más bajo, entre 532 y 502 nm.

El solvente, metanol ácido, ayuda a marcar la diferencia, ya que las antocianinas se vuelven más rojas, y por lo tanto, su máximo de absorción se desplaza a  $\lambda$  menores. Este aspecto es útil para diferenciarlas, ya que se cumple de modo general (Khan y Giridhar, 2015).



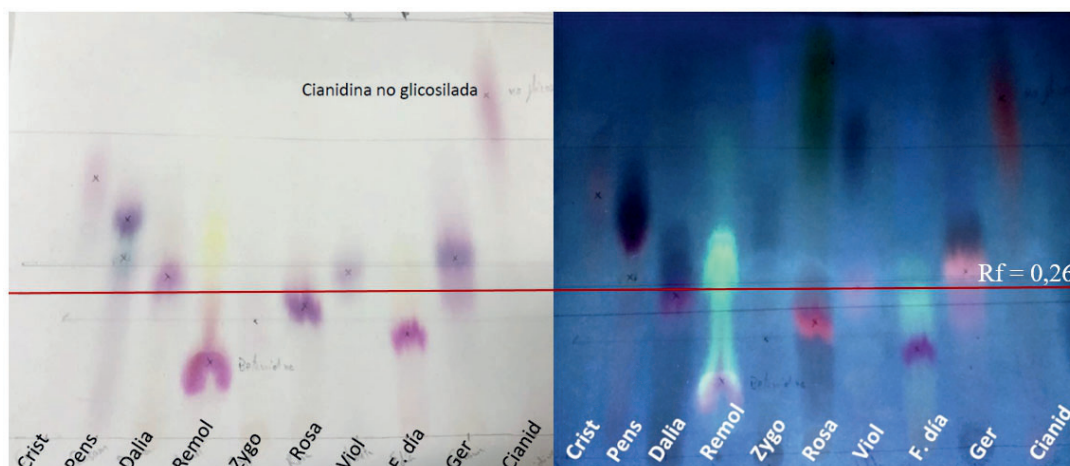
**Figura 4.** Espectros de absorción de luz de los extractos de betacianinas (A-C) y antocianinas (D-I) en metanol-HCl para  $\lambda$  entre 400 y 600 nm. Se indica el valor de  $\lambda$  en la cual se alcanza el máximo de absorción.

En este experimento, destaca el solapamiento de los espectros de flor del día y violeta. Esto indica que el color del extracto de violeta tiende a ser morado, a pesar de las condiciones ácidas, lo que puede deberse a alguna modificación que aporta estabilidad y color azul, como un grupo acilo.

#### Cromatografía en papel de antocianinas y betacianinas

El valor de Rf en este tipo de cromatografía es indicativo para diferenciar betacianinas de antocianinas, ya que la migración de las primeras es escasa, mucho menor que la de las antocianinas en general (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Como puede observarse en la **Fig. 5** y en las **Tablas 3** y **4**, el Rf de las betalaínas se situó por debajo de 0,26, mientras que todas las antocianinas mostraron valores superiores. En el cromatograma aparecen otros compuestos del extracto crudo que pueden co-migrar o no con los pigmentos en estudio y que pueden apreciarse bajo radiación ultravioleta.





**Figura 5.** Cromatograma en papel BAW (8:2:1) de los extractos en estudio (dcha.), y visualización bajo radiación ultravioleta de 350 nm (izq.). Avance del frente: 13,5 cm. Se marca, como referencia, el valor de Rf de 0,26.

La **Tabla 3** muestra la aproximación de la identidad de las antocianinas aisladas tomando como referencia los valores de Rf de Harborne (1973). La migración de las antocianinas en BAW es inversamente proporcional al número de glicosilaciones y, a su vez, es característica para cada antocianidina. Así, la cianidina (no glicosilada) es la que más migra. Además, si se encuentran aciladas, migran más, son más estables y más azules (Horbowicz *et al.*, 2008), por lo que la violeta africana, dada su estabilidad en NaOH, y su color fuerte, parece poseer malvidina 3-acetilrutinosido-5-glucósido, como se ha visto en el estudio de Tatsuzawa y Hosokawa (2016).

**Tabla 3.** Resultados de la cromatografía en BAW y de la espectroscopía, y antocianinas probables.

Nombre común	Color de la muestra	Rf en BAW	$\lambda$ máx MetOH-HCl (nm)	Antocianina
Pensamiento	Morado intenso	0,38 0,48	532	Delfinidina 3-glucósido (azul) Petunidina 3-glucósido
Violeta africana	Violeta intenso	0,37	534	Malvidina 3-acetilrutinosido 5-glucósido
Rosa	Púrpura	0,28	524	Cianidina 3,5-triglucósido
Geranio	Rosáceo	0,40	520	Pelargonidina 3,5-diglucósido
Dalia	Rosa	0,35	524	Cianidina 3,5-diglucósido
Cristalina	Rosa intenso	0,57	522	Cianidina 3-glucósido
Cianidina	-	0,80	-	Cianidina

Las betacianinas poseen modificaciones de la estructura principal más heterogéneas, y su color es poco variable (Khan y Giridhar, 2015), por lo que los análisis realizados no son los adecuados para identificarlas. Aun así, es posible distinguir dos tipos de betalaínas en la cromatografía: betacianinas y betaxantinas (Fig. 5). Las betacianinas aparecen como una mancha morada. En remolacha, la mancha no está bien definida, por lo que probablemente haya más de un tipo de betacianina, betaninas, la mayoría; en la imagen bajo UV, se observa un rastro de betaxantina fluorescente (miraxantinas y vulgaxantinas, unidas a distintos aminoácidos). En el cactus de Navidad, aparece una betacianina rosácea. *Mirabilis jalapa*, la flor del día, muestra dos tipos de pigmentos, una betacianina, y un rastro de betaxantina, probablemente miraxantinas (Khan y Giridhar, 2015; Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

**Tabla 4.** Resultados de la cromatografía en BAW y de la espectroscopía de las muestras de betacianinas.

Nombre común	Color de la muestra	Rf en BAW	$\lambda$ máx (MetOH-HCl) (nm)
Remolacha roja	Morado intenso	0,16	546 y 482
Cactus de Navidad	Granate	0,25	536
Flor del día	Granate	0,22	544

En vista de estos resultados, puede concluirse que las pruebas empleadas son eficaces para distinguir entre antocianinas y betacianinas, y que permiten la caracterización aproximada de antocianinas, aunque no son completamente adecuadas para la de betacianinas. Los cambios de color en función del pH permiten una distinción rápida, pero, en caso de que los colores de las antocianinas sean oscuros, el pH ácido no supone un viraje al rojo muy marcado. De la misma manera, si el color no cambia en la extracción, los picos de máxima absorbancia tampoco marcarán la diferencia. Por el contrario, la estabilidad, tanto en pH alcalino, como en tratamiento ácido-térmico, ha resultado un aspecto diferencial capaz de disipar estas dudas de color: las betacianinas son inestables, y se degradan en estos tratamientos. La cromatografía en papel con fase móvil BAW permite separar antocianinas de betacianinas eficazmente, y, además, permite la separación de los distintos tipos de antocianinas, para su caracterización.

### Bibliografía

Brockington, S.F., Walker, R.H., Glover, B.J., Soltis, P.S., y Soltis, D.E. (2011). Complex pigment evolution in the Caryophyllales. *New Phytologist* 190, 854-864.

- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A.R., y Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40,173-289.
- García Carmona, F., Gandía Herrero, F., y Escribano, J. (2011). Flores fluorescentes. *Investigación y Ciencia* 415, 50-57.
- Harborne, J.B. (1973). Phenolic Compounds. En *Phytochemical Methods* (ed. Chapman and Hall) pp. 33-88, Londres, Reino Unido.
- Horbowicz, M., Grzesiuk, A., Dębski, H., y Kosson, R. (2008). Anthocyanins of fruits and vegetables - Their occurrence, analysis and role in human. *Vegetable Crops Research Bulletin* 68, 5-22.
- Khan, M.I., y Giridhar, P. (2015). Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochemistry* 117, 267-295.
- Polturak, G., y Aharoni, A. (2018). «La Vie en Rose»: Biosynthesis, sources and applications of betalain pigments. *Molecular Plant* 11, 7-22.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., y Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal* 54, 733-749.
- Tatsuzawa, F., y Hosokawa, M. (2016). Flower colors and their anthocyanins in *Saintpaulia* cultivars (Gesneriaceae). *The Horticulture Journal* 85, 63-69.
- Welch, C.R., Wu, Q., y Simon, J.E. (2008). Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. *Current Analytical Chemistry* 4, 75-101.