



Universidad
Zaragoza

*ELABORACIÓN DE UN KIT COLORIMÉTRICO DE PH A
PARTIR DEL EXTRACTO VIOLETA DE LA COL
LOMBARDA; ESTUDIO DE PROPIEDADES QUÍMICO-
FÍSICAS DE ESTOS PIGMENTOS.*

*PH COLORIMETRIC KIT DEVELOPMENT BASED ON
VIOLET RED CABBAGE'S EXTRACT; STUDY OF
CHEMICAL-PHYSICAL PROPIERTIES OF THESE
PIGMENTS.*

AUTORA

MARÍA TEJERO PÉREZ

DIRECTOR

JAVIER GALBÁN BERNAL

DEPARTAMENTO

QUÍMICA ANALÍTICA

LABORATORIO DE BIOSENSORES ANALÍTICOS

CURSO 2019/2020

RESUMEN

Las antocianinas presentes en el extracto de la col lombarda son pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos. Al ser moléculas antioxidantes protegen a la planta de la luz ultravioleta y frente a la formación de radicales libres. Estas moléculas son susceptibles a cambios en el pH del medio por lo que el extracto puede tomar colores muy diversos que van desde el rojo-rosado a pHs bajos hasta el amarillo a pHs altos, pasando por tonos rosas, violetas, azules y verdes.

Aprovechando estas propiedades ácido-base se plantea elaborar un kit colorimétrico de pH en diferentes formatos, para el cual será necesario relacionar color con pH. Esto se puede realizar mediante espectroscopía ultravioleta-visible y aplicaciones informáticas que den una lectura del color en RGB, hexadecimal, etc.

Además, estos pigmentos también tienen propiedades colorimétricas redox que pueden ser utilizadas para complementar estos kits de pH, siendo un interesante campo de estudio a la hora de utilizarlas en reacciones enzimáticas para la detección de sus sustratos.

De esta forma, todo converge cuando se maqueta artísticamente el producto físico a través de varias aplicaciones que facilitan el desarrollo de los embalajes, las tablas de comparación y las instrucciones; así como el material de laboratorio necesario que deben incluir para tomar las medidas en los diferentes soportes.

ABSTRACT

The anthocyanins present in the extract of the red cabbage are water-soluble pigments that are found in the vacuoles of the plant cells and that give the red, purple or blue color to the leaves, flowers and fruits. Being antioxidant molecules, they protect the plant from ultraviolet light and against the formation of free radicals. These molecules are susceptible to suffer changes because of the pH of the medium, which is why the extract can take on very different colors, ranging from red-pink at low pHs to yellow at high pHs, passing through pink, violet, blue and green tones.

Taking advantage of these acid-base properties, it is proposed to develop a colorimetric pH kit in different formats, for which it will be necessary to relate color to pH. This can be done using ultraviolet-visible spectroscopy and computer applications that give a color reading in RGB, hexadecimal, etc.

In addition, these pigments also have redox colorimetric properties that can be used to complement these pH kits, being an interesting field of study when using them in enzymatic reactions for the detection of substrates.

In this way, everything converges when the touchable product is artistically assembled through various applications that facilitate the development of packaging, comparison tables and instructions; as well as the necessary laboratory material that must be included to take the measurements in the different formats.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La col lombarda	1
1.2 Pigmentos en los vegetales. Antocianinas	1
1.3 Indicadores ácido-base.....	4
1.4 El color y su medida	4
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO.....	5
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	6
3.1 Reactivos y disoluciones.....	6
3.1.1 Disolución Rojo Congo	6
3.1.2 Tampon universal	6
3.1.3 Disoluciones de ajuste del pH para el tampon universal.....	6
3.1.4 Disoluciones tampon ajustadas a diferentes pHs.....	7
3.1.5 Disolución de peróxido de hidrógeno, peroxidasa y glucosa-oxidasa	7
3.2 Instrumentos y materiales	7
3.2.1 Instrumentos.....	7
3.2.2 Materiales y aparatos	7
3.3 Procedimiento operativo	8
3.3.1 Corte histológico.....	8
3.3.2 Extracción con ultrasonidos vs extracción por cocción	8
3.3.3 Liofilización del extracto	8
3.3.4 Colores de las diferentes disoluciones de pH tamponado	9
3.3.5 Adsorción del extracto sobre celulosa y comprobación de la reactividad al pH.....	9
3.3.6 Ensayo rédox.....	9

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
4.1 Corte histológico	10
4.2 Extracción con ultrasonidos vs extracción por cocción.....	10
4.3 Liofilización del extracto.....	11
4.4 Colores de las diferentes disoluciones de pH tamponado.....	11
4.5 Fluorescencia a diferentes pHs	15
4.6 Estabilidad del extracto a diferentes pHs respecto al tiempo	15
4.7 Adsorción del extracto sobre celulosa, comprobación de la reactividad al pH y estabilidad de los colores frente al tiempo	18
4.8 Ensayo rédox	20
4.9 Desarrollo del material gráfico.....	22
5. CONCLUSIONES	23
6. BIBLIOGRAFÍA	24
7. ANEXO 1. Perfil de las antocianinas y capacidad antioxidante.....	26
8. ANEXO 2. Formas estructurales inducidas por el pH	28
9. ANEXO 3. Prototipos y plantillas	32

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La col lombarda

Brassica oleracea var. *capitata* f. *rubra*, de nombre común **lombarda**, **col lombarda**, **repollo morado**, **col morada** o **berza morada**, es una planta de la familia del repollo (y ambas de las coles). Es un grupo en el que las hojas poseen un color violáceo característico. Este color es debido a la presencia de una familia de pigmentos llamada antocianinas. La coloración de estos pigmentos depende en gran medida de la acidez (pH) del suelo, por lo cual las hojas pueden crecer más rojas en suelos de carácter ácido (*Figura 1.1*) mientras que en los alcalinos son más azules (*Figura 1.3*) y en los neutros son violetas (*Figura 1.2*).



Figura 1.1¹
Col lombarda que ha crecido en suelos ácidos



Figura 1.2²
Col lombarda que ha crecido en suelos neutros



Figura 1.3²⁴
Col lombarda que ha crecido en suelos alcalinos

Es ampliamente sabido que la col lombarda tiene beneficiosas propiedades para la salud. Es baja en calorías, rica en compuestos de azufre, vitamina C y ácido cítrico. Aporta mucha fibra, lo que le confiere propiedades laxantes. Además, es una fuente importante de antioxidantes.⁴

El extracto de col lombarda tiene un característico color violeta que ha sido empleado para introducirnos desde que éramos pequeños en el mundo de la química, ya que probablemente fuera nuestro primer contacto con el término 'pH' e 'indicador'. Los distintos y llamativos colores captaban nuestra atención promoviendo nuestro interés y haciéndonos ver que la ciencia ni tiene por qué ser aburrida ni tiene por qué ser incompatible con el arte.

1.2 Pigmentos en los vegetales. Antocianinas.

Los pigmentos naturales se encuentran en los seres vivos y aportan coloración a estos, siendo esta coloración el resultado de la mezcla y/o predominio de los diferentes pigmentos. Los pigmentos fotosintéticos son moléculas que normalmente se encuentran unidas a proteínas presentes en las membranas de los tilacoides para poder intervenir en la fotosíntesis.

Según el autor que se consulte se encuentran clasificaciones muy diversas, una clasificación de ellas podría ser: isoprenoides (carotenoides), tetrapirrólicos (clorofilas, porfirinas, hemo), benzopiranos (flavonoides, flavonas, taninos) y otros como las betalaínas y las quinonas.⁵ Aunque es difícil encontrar una clasificación absoluta.

Las antocianinas (del griego ἀνθός (anthos): ‘flor’ + κυανός (kyáneos): ‘azul’) son pigmentos hidrosolubles que pertenecen a la subfamilia de los flavonoides⁸. Se hallan en las vacuolas de las células vegetales y otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos. Al ser moléculas antioxidantes protegen a la planta de la luz ultravioleta y frente a la formación de radicales libres. En otoño, cuando la clorofila se descompone, los flavonoides incoloros se convierten en antocianinas, dando colores brillantes. Esta transformación química que consiste sólo en la pérdida de un átomo de oxígeno es la responsable de nuestra percepción de los colores del otoño.

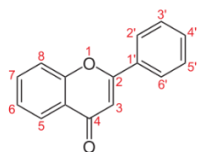


Figura 1.4. La molécula ‘Flavona’.⁹

Depende de la autora que se consulte la estructura base de las antocianinas varía. Así, para *Yijun Chen et al*¹⁰ el núcleo de la estructura es el que se encuentra en la parte izquierda de la *Figura 1.5* mientras que para *Ampaporn Munmai et al.*¹¹ el núcleo es el que se encuentra a la derecha.

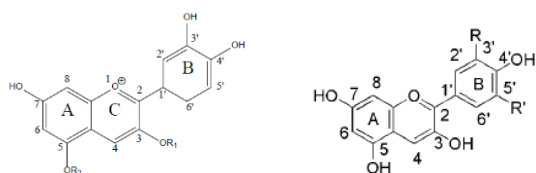


Figura 1.5

Diferentes propuestas para el núcleo de las antocianinas.

Yo tomaré como núcleo la estructura más genérica que he encontrado (*Figura 1.6*).

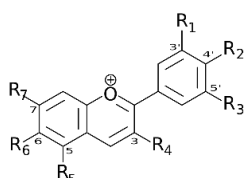


Figura 1.6¹²

Núcleo más genérico para las antocianinas

Lo que se puede sacar en claro es que todas las antocianinas comparten la estructura de dos ciclos condensados, uno de los cuales contiene un átomo de oxígeno con carga positiva a los que llaman respectivamente A y C y otro ciclo unido a estos en la posición 2. A este conjunto catiónico se le conoce como catión flavilio (*Figura 1.7*).

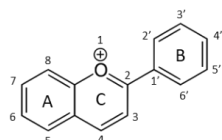


Figura 1.7¹³ (editada)

Catión ‘Flavilio’

Dependiendo de los sustituyentes que tenga ‘colgados’ este catión, se pueden encontrar diferentes moléculas como las que se muestran en la *Tabla 1.1*.

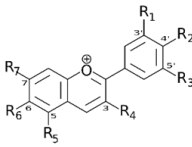
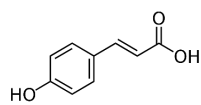
	Nombre	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
	Aurantidinina	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-OH
Capensinidina	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-H	-OH	-OH
Cianidina	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH	-OH
Delfinidina	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH	-OH
Europinidina	-OCH ₃	-OH	-OH	-OH	-OCH ₃	-H	-OH	-OH
Luteolinidina	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OH	-OH
Pelargonidina	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH	-OH
Malvidina	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH	-OH
Peonidina	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH	-OH
Petunidina	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH	-OH
Rosinidina	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OCH ₃	-OH

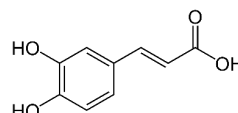
Tabla 1.1⁸

Diferentes antocianinas. Su nombre depende de los sustituyentes que tenga el núcleo.

Se puede decir que las antocianinas son sales de flavilio, además, los azúcares que pueden 'colgar' comprenden a los monosacáridos (glucosa, galactosa, arabinosa, etc), disacáridos y trisacáridos (lineales y ramificados). También, estos azúcares pueden ser acilados, normalmente con ácidos fenólicos como los ácidos para-cumárico y cafeico (Figura 1.8 A y B) que le otorgan estabilidad a la molécula mediante interacciones intra-moleculares. Gracias al catión flavilio y a su alto grado de conjugación, se expresa esa amplia gama de colores.¹⁴

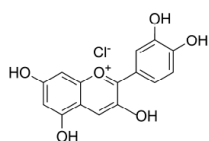


Ácido para-cumárico
Figura 1.8 A

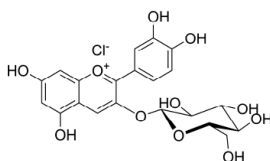


Ácido cafeico
Figura 1.8 B

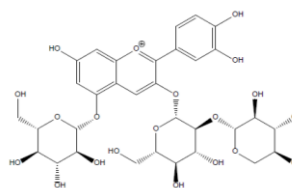
Las principales antocianinas de la col morada son derivados de la cianidina, la cual puede estar acilada con diferentes moléculas como los grupos benzoyl y/o cinnamyl¹⁵. En la Figura 1.9 A, B y C vemos algunos ejemplos con glucosa y un disacárido (soforosa).



Cianidina
Figura 1.9 A



Cianidina 3-glucoside
Figura 1.9 B

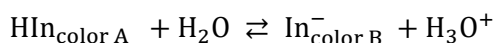


Cianidina 3-sophoroside-5-glucoside
Figura 1.9 C

Estas moléculas poseen propiedades ácido-base ya que dependiendo del pH del medio en el que se encuentren experimentan un tipo de reacción u otra. Así, por ejemplo, en medios ácidos la molécula de cianidina (pudiendo estar también glucosilada) se puede protonar pudiendo dar cinco bases quinonoidales distintas (una por cada OH⁻) (ver Anexo 2) haciendo que cambie el sistema π -electrónico y con ello probablemente también el color percibido, por lo que pueden ser un posible indicador ácido-base.

1.3 Indicadores ácido-base

Los indicadores ácido-base son compuestos que cambian de color dependiendo del pH del medio en el que se encuentren. Así se establece un equilibrio entre su forma ácida y su base conjugada ambas con colores diferentes según la reacción:



En disoluciones ácidas la concentración del ion oxonio es elevada por lo que el equilibrio se desplaza hacia la izquierda según el principio de Le Châtelier y aparece el color A, ocurre lo contrario cuando esta concentración es baja (en disoluciones básicas): el equilibrio se desplaza hacia la derecha apareciendo el color B.

Para que el ojo humano detecte con claridad el cambio de color se dice que la concentración de una de las formas debe ser superior o igual a 10 veces la concentración de la otra, así suele haber un cambio gradual de color que suele abordar entre una y dos unidades de pH. A este cambio de color se le denomina 'viraje del indicador' por lo que todo indicador tiene un intervalo de viraje que es característico del propio indicador.

Actualmente hay varios compuestos que actúan como indicador ácido-base y podemos encontrar un indicador adecuado para cada pH. Quizás uno de los más conocidos sea la fenolftaleína cuyo intervalo de viraje se encuentra entre 8 y 10 unidades de pH pasando respectivamente de incoloro a magenta intenso.

Al ser ácidos y bases débiles no se deben usar en exceso ya que podrían alterar demasiado el sistema ácido-base estudiado.

1.4 El color y su medida

En la retina del ojo existen millones de células somáticas especializadas en detectar las diferentes longitudes de onda procedentes de nuestro entorno. Estas células fotorreceptoras se denominan 'conos' y 'bastones' y son estimuladas por parte del espectro electromagnético de la luz, la cual interacciona con la materia. Estas células transforman esta información en impulsos eléctricos gracias al efecto fotoeléctrico que son enviados a través de los nervios ópticos procesando la sensación de color.

Esta parte del espectro electromagnético que procesan nuestros conos y bastones se conoce como 'espectro visible' y comprende las longitudes de onda desde unos 380 nm hasta los 800 nm. Pese a que podemos medir con exactitud el espectro de un color determinado, el concepto de color es totalmente subjetivo ya que depende de las características del sistema biológico que procesa esa información.

Normalmente los principios en los que se basa la percepción del color defienden que cuando vemos un color esto es resultado bien de que esa interacción radiación-materia absorba todas las longitudes de onda y refleje una sola viendo su color en cuestión o bien que solo absorba una longitud de onda y refleje el resto, viendo así el color complementario, lo cual se puede relacionar mediante 'el círculo cromático' (*Figura 1.11*). Cabe destacar que la clasificación tradicional de colores (rojo, naranja, amarillo...) corresponde normalmente a un conjunto de longitudes de onda y no a una sola.

Así, por ejemplo, las clorofilas tienen típicamente dos tipos de absorción en el espectro visible, uno en el entorno de la luz azul (400-500 nm de longitud de onda), y otro en la zona roja del espectro (600-700 nm); sin embargo, reflejan la parte media del espectro, la más nutrida y correspondiente al color verde (500-600 nm) (Figura 1.10). Esta es la razón por la que las clorofilas se ven de color verde.⁶

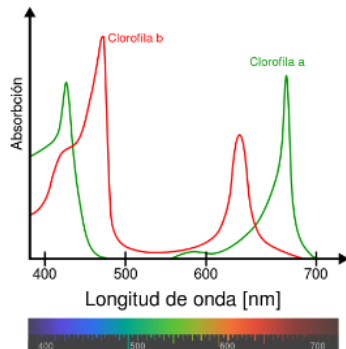


Figura 1.10
Espectros de absorción de la clorofila a y la clorofila b.⁷

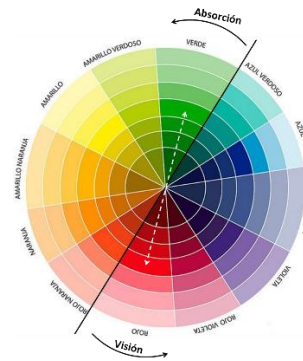


Figura 1.11
El círculo cromático

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

El objetivo de este proyecto es elaborar desde cero un prototipo de producto comercial, en este caso un kit colorimétrico de pH en diferentes formatos basados en el extracto violeta de la col lombarda. Los pasos comprenden desde formar una idea hasta llegar a imaginar el producto en el stand de una tienda, todo ello pasando por el planteamiento y desarrollo experimental y la maqueta artística del producto. Es decir, desarrollar todos los pasos a los que se ve sometido un nuevo producto. Cabe destacar que la intención no es desarrollar un producto revolucionario sino demostrar la capacidad de enfrentar el desarrollo de este producto, planteando los experimentos necesarios y extrayendo de ellos la información que fuera necesaria, así como ayudarse del marketing para desarrollar el producto físico. Cualquier persona estaría a su alcance de utilizar el kit incluso si no se tienen conocimientos sólidos en química. Además, al estar basado en una hortaliza, nuestro indicador tiene matices ecológicos.

También, comparar las diferentes vías de extracción, en este caso la asistida por ultrasonidos y la cocción tradicional; estudiar la compatibilidad frente a la adsorción del extracto en celulosa; observar el comportamiento del extracto frente al tiempo y visualizar la fisiología de las hojas de la col bajo el microscopio.

Además, se aprovecharía los extractos para poder estudiar algunas de sus propiedades químico-físicas, como su estabilidad frente al pH o la capacidad redox (pudiendo incluso desarrollar otro kit, pero esta vez redox) así como observación cualitativa de la solubilidad en agua e intensidad óptica de los pigmentos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos y disoluciones

- Celulosa microcristalina 20 μm Sigma Aldrich

3.1.1 Disolución Rojo Congo

- Rojo Congo Fluka AG

Para hacer esta disolución se pesan 0,012 gramos de pigmento sólido y se diluyen con 10 ml de agua desionizada; se guardan en un tubo falcon en la nevera.

3.1.2 Tampon universal

- Citrato de sodio dihidrato al 99%
- Hidrógenofosfato de sodio anhidro Panreac al 99%
- Cloruro de Potasio Panreac 100%
- Ácido bórico Meyerk al 100%
- Tris(hidroximetil)aminometano 'Tris' Panreac al 100%

Esta disolución debe ser aproximadamente 0,1 M de cada soluto, para ello se pesan y diluyen a 1 L final de disolución 7,3525 gramos de citrato de sodio, 3,5490 gramos de fosfato monoácido de sodio, 3,0285 gramos de Tris, 1,8638 gramos de cloruro de potasio y 1,5458 gramos de ácido bórico. Se agita para mezclar y se conserva en un frasco de vidrio topacio en la nevera.

3.1.3 Disoluciones de ajuste del pH para el tampon universal

- Ácido clorhídrico de pureza 35-38% Poch
- Hidróxido de sodio de pureza 98% Scharlab

Se preparan disoluciones de HCl y NaOH 0,4 M a 50 ml en tubos falcon para llevar la disolución de tampon universal al pH que interese; junto con otras dos disoluciones de HCl y NaOH 0,04 M a 100 ml también en tubos falcon para un ajuste 'fino' (para que no variara tanto el pH ya que con 0,4 M variaba con cada gota adicionada con pipeta en 0,01 unidades de pH aproximadamente).

Para preparar las de aproximadamente 0,04 M se toman 323 μL de HCl concentrado (cálculos con 38% de pureza) y 182 mg (masa que se debería haber cogido = 163,26 mg) de NaOH de pureza 98% llevando ambos compuestos individualmente a 100 ml con agua desionizada.

Para preparar las de aproximadamente 0,4 M se cogen 1,6 ml aproximadamente de HCl concentrado y 0,79 gramos de NaOH hasta 50 ml en agua desionizada. Cabe destacar que la concentración exacta de estas disoluciones no es relevante ya que solo se usarán como disoluciones auxiliares.

3.1.4 Disoluciones tampon ajustadas a diferentes pHs

Para preparar las diferentes disoluciones de pH conocido y tamponado se procede echando en un tubo falcon unos 40 ml de disolución de tampon universal y previamente calibrado el phmetro se introduce en el tubo. Cuando se estabiliza el pH (normalmente a 8,85) se echa cierto volumen de las disoluciones auxiliares de HCl y NaOH para ajustar su pH. Así se obtienen diferentes tubos de pH tamponado de 2 a 12, además de las propias auxiliares cuyos pHs eran 1,66 para la de HCl 0,4 M y 13,03 para la de NaOH 0,4 M. Estas disoluciones se emplearán para luego añadirse al extracto de col y poder visualizar su color.

Estas disoluciones fueron comprobadas a lo largo de los días, de vez en cuando hubo que rehacer alguna debido a la aparición de hongos pero todas mantenían su pH constante a lo largo del tiempo.

3.1.5 Disolución de peróxido de hidrógeno, peroxidasa y glucosa-oxidasa

- Disolución de peróxido de hidrógeno 10^{-2} M ya preparada.
- Disolución de peroxidasa (HRP) Sigma Aldrich 146 U/mg de concentración desconocida ya preparada.
- Glucosa-oxidasa de *Aspergillus niger* Sigma Aldrich 149,5 U/mg

La disolución de glucosa-oxidasa (GOx) es de concentración desconocida ya que en el frasco solo quedaban los restos amarillos de esta enzima, se le añadió 1 ml de agua desionizada al frasco para diluir estos restos y se trabajó con esta disolución. Se podía saber la concentración si se hubiera hecho espectro uv-vis ya que el coeficiente de extinción molar es conocido.

Es necesario recalcar que estas disoluciones estaban inicialmente pensadas para un ensayo meramente cualitativo.

3.2 Instrumentos y materiales

3.2.1 Instrumentos

- Espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis Specord 210 plus, con lámparas de wolframio y deuterio y rango de medida de 300 a 900 nm.
- Espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis Agilent 8453A, con lámparas de wolframio y deuterio, red de fotodiodos y rango de medida de 190 a 1100 nm.
- Balanza analítica A&D Instruments GR-202-EC de precisión $\pm 0,01$ mg
- pHmetro CRISON, Basic 20.

3.2.2 Materiales y aparatos

- Cuchillas
- Pipetas y micropipetas de volumen variable
- Material de vidrio diverso: porta-objetos, vasos, varillas, vidrio de reloj
- Material de plástico de volumen variable: Eppendorfs, tubos falcon y pocillos
- Cubetas de acrílico de 1 cm de paso óptico
- Agitador y núcleo magnéticos
- Microscopio Kyowa optical modelo SD-2P
- Ultrasonidos de 110 W de potencia y 50/60 Hz de frecuencia J.P. Selecta
- Liofilizador Telstar Lyoquest-85
- Centrífuga Heraeus Multifugue X1R Thermo Fisher scientific, Walthman.
- Lámparas UV de 360 nm y 254 nm emisión

3.3 Procedimiento operativo

3.3.1 Corte histológico

Para observar las hojas y poder visualizar las células de la hoja de la col se realiza un corte histológico con una cuchilla sacando una fina lámina, se coloca en un porta-objetos y se deja secar envuelta en papel durante 24h conservada en la nevera. Se toman con la pipeta de la disolución Rojo Congo unas gotas que se echan sobre la hoja del porta esperando 6 minutos y después lavando con agua desionizada el exceso de colorante. Se visualiza al microscopio óptico.

3.3.2 Extracción con ultrasonidos vs extracción por cocción

Para la extracción con ultrasonidos se pesan 6,06 gramos de hojas troceadas y se colocan en un vaso de precipitados con 40 ml de agua desionizada. Se agita ese vaso con ultrasonidos durante 15 minutos a una potencia de 110 W, en donde el baño inicialmente estaba a 20°C, pasa por 30°C, se vuelve a agitar durante 15 minutos y la temperatura termina en 33°C.

De ese extracto se cogen 100 microlitros y se diluyen en una cubeta de plástico con 2 ml de agua desionizada y se mide el espectro de absorción uv-vis desde 300 nm hasta 850 nm.

Posteriormente se centrifuga el extracto ultrasónico a 5000 revoluciones durante 10 minutos en dos tubos falcon. Cuando termina de centrifugar se decanta el sobrenadante y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones.

Para la extracción por cocción se pesan 0,479 gramos de col y se añaden a un vaso de precipitados previamente calentado a 100 °C y agitado con 50 ml de agua desionizada. Se deja 20 minutos y cuando termine este tiempo se para de calentar y se deja enfriar lo suficiente para poder verter y colar la disolución, pudiendo recuperar las hojas. Se deja reposar hasta alcanzar temperatura ambiente tapado con un vidrio de reloj para evitar que entre polvo o cualquier otra sustancia.

Se mide la absorbancia del extracto extraído por ultrasonidos y por cocción haciendo diluciones 0,1:2 y 2:1 respectivamente. Las medidas se tomaron con un espectrofotómetro Specord 210 plus. Rendija 1 nm. Cambio de lámpara a 320 nm rango 300-900 nm. Velocidad 10 nm/s.

Después de la primera extracción se dejan en agua desionizada a temperatura ambiente las hojas ya extraídas para ver si se extraía algo más a lo largo de la sesión.

3.3.3 Liofilización del extracto

Un extracto sacado de la extracción por cocción de 10 gramos de hojas de col aforado en 50 ml de agua desionizada durante 30 minutos se liofiliza en un matraz de 100 ml. Se tarda 24 horas en liofilizar. Cuando esté listo se tapa con tapón de plástico para matraces y Parafilm para evitar la entrada de humedad. Se conserva en el congelador.

3.3.4 Colores de las diferentes disoluciones de pH tamponado

Para saber qué color corresponde a cada pH se toman diez alícuotas de 1 ml del extracto extraído por cocción del punto 3.3.2 y se colocan en diez cubetas de acrílico de 1 cm de paso óptico. A cada alícuota se añade 1 ml de una disolución amortiguada de pH conocido para poder observar el cambio de color que experimentaba (disolución 1:1, 1 ml de extracto + 1 ml de tampon). Se mezcla suavemente con un ligero movimiento, se toma foto y se procede a realizar sus espectros de absorción UV-Vis desde 300 nm hasta 700 nm.

Una vez terminados estos espectros se procede a reforzar con 1 ml más de extracto cada cubeta (disolución 2:1, 2 ml de extracto + 1 ml de tampon) y realizar otra vez los correspondientes espectros UV-Vis desde 300 nm hasta 700 nm. Se guardan en la nevera tapadas con papel de plata para evitar la entrada de luz.

3.3.5 Adsorción del extracto sobre celulosa y comprobación de la reactividad al pH

Para hacer una primera toma de contacto se ensayan los diferentes pHs directamente sobre las hojas de la col echando una gota sobre su superficie. Lo que más adelante se llamará 'autosoporte'.

Posteriormente, para adsorber el extracto sobre celulosa se toman 60 mg de celulosa microcristalina en polvo de 20 μm y se diluyen en 1,5 ml de agua desionizada en un tubo eppendorf de 2 ml de volumen total. Después, se toma una punta de espátula del extracto liofilizado sin saber la masa exacta ya que es difícil pesar tan poca cantidad porque da una coloración muy intensa con poca masa, y se diluye en 5 ml de agua desionizada; de esta disolución se toman 0,5 ml y se la añade al eppendorf que contiene la celulosa. Así hay un 3% en celulosa.

Se debe agitar vigorosamente ya que a la celulosa le cuesta diluirse, por lo que se busca suspenderla, así inmediatamente tras agitar se toman 75 μL del eppendorf y rápidamente se depositan sobre una tapa de pocillos. Se repite el procedimiento hasta que no quede nada en el eppendorf. Para terminar, se mete la placa en una estufa a 35 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas para secar la placa y que quede una película de celulosa con pigmento depositada.

Para comprobar la reactividad frente al pH simplemente se echa sobre cada pocillo con celulosa seca una gota del pH del cual se quiere saber el cambio de color, así se tienen resultados para los pHs comprendidos entre 2 y 12, ambos incluidos.

3.3.6 Ensayo rédox

Para saber si el extracto posee propiedades colorimétricas dentro de un sistema rédox se plantea un ensayo cualitativo. Para ello primeramente se prepara una placa de pocillos blancos en dos de los cuales se añaden 200 μL de tampon pH 8, 100 μL de extracto proveniente de cocer 10 gramos de hojas en 50 ml de agua desionizada y dejarlo 30 minutos extrayéndose, y 10 μL de peroxidasa; en el blanco se añadieron 10 μL de agua y en el otro se añadieron 10 μL de peróxido de hidrógeno.

Tras visualizar los resultados se prepara una cubeta de acrílico de paso óptico 1 cm con 2 ml de tampon de pH 8 y 1 ml de extracto. Se coloca la cubeta en el espectrofotómetro en modo 'cinética', se echan 100 μL de la disolución de peroxidasa del punto 3.1.5 en la cubeta y se observan los resultados.

Después, se añaden 100 μL de la disolución de peróxido de hidrógeno a la cubeta mientras el espectrofotómetro sigue midiendo y se vuelve a observar si ha habido o no reacción.

Para ensayar el sistema con la enzima glucosa-oxidasa (GOx) se toman 14,2 mg de extracto liofilizado y se añaden 300 μL de tampon pH 6 para formar una disolución. En una placa blanca de pocillos se añaden en dos pocillos adyacentes 5 μL de esta disolución, 2 μL de disolución de GOx y 100 μL de tampon pH 6; después, en uno de los pocillos se añade 2 μL de HRP y en la disolución del blanco 2 μL de tampon pero en ninguna se añade glucosa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Corte histológico

Se puede observar, como se muestra en las *Figura 4.1 A y 4.1 B*, las paredes celulares teñidas en rojo ya que se consigue extraer una lámina de hoja en parte de la cual el grosor es de una célula. Como se ha mencionado antes, estas células almacenan en sus vacuolas las antocianinas, aquí no se aprecia ya que la hoja había sido previamente cocida consiguiendo extraer los pigmentos.

4.2 Extracción con ultrasonidos vs extracción por cocción

El objetivo de centrifugar el extracto ultrasónico es intentar eliminar la aparente turbidez de la disolución. Tras centrifugar y decantar se ve que no es turbidez sino que el color es simplemente intenso.

Tras analizar el espectro de absorción uv-vis desde 300 nm hasta 850 nm del extracto por ultrasonidos se observa un único pico de absorción a 553-554 nm con una absorbancia de 0,115 siendo el mínimo a 750 nm y 0,0122 unidades de absorbancia. El blanco se hizo con agua desionizada. Por lo tanto, si del extracto original se cogen 100 μL y se diluyen con 2 ml de agua, la absorbancia del extracto original es $0,115 \cdot \frac{2,1}{0,1} = 2,415$. Esto es extraído en 40 ml de agua desionizada, **6,06** gramos de hojas, durante 30 minutos mediante una rampa de temperatura de 20 $^{\circ}\text{C}$ hasta 33 $^{\circ}\text{C}$.

Para la extracción por cocción se obtuvo un pico de absorción a 554 nm con una absorbancia de 0,1298 y otro pico de absorción a 319 nm (UV cercano/visible) con absorbancia de 1,0681 unidades. El blanco se hizo con agua desionizada. Por lo tanto, si del extracto original se cogen 2 ml y se diluyen con 1 ml de agua, la absorbancia del extracto original es $0,1298 \cdot \frac{3}{2} = 0,1947$. Esto es extraído con 50 ml de agua desionizada, **0,479** gramos de hojas durante 20 minutos mediante una rampa de temperatura de 20 $^{\circ}\text{C}$ hasta 100 $^{\circ}\text{C}$.

Si se calcula la absorbancia por unidad de masa, volumen de disolvente y tiempo da $3,3210 \cdot 10^{-4} \text{ A g}^{-1} \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para el ultrasónico y $4,0647 \cdot 10^{-4} \text{ A g}^{-1} \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para el cocido. Todo ello sin tener en cuenta la temperatura. Se observa que por unidad de masa de col y tiempo de extracción el rendimiento es mayor por cocción que por ultrasonidos. A simple vista es apreciable, ya que el extracto por ultrasonidos tiene un color más pálido que por cocción, teniendo este el mismo color pero mucho más intenso. Las hojas ya extraídas que se dejaron en agua no sueltan mucho más color aunque no se puede especificar el porcentaje, se podía intuir este hecho ya que después de la primera extracción estaban casi blancas como se ve en la *Figura 4.2*.

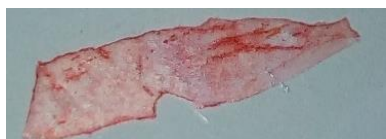


Figura 4.1 A
Lámina de col lombarda teñida sobre un porta.



Figura 4.1 B
Detalle al microscopio óptico de la hoja teñida.



Figura 4.2
Segunda extracción de las hojas cocidas.

4.3 Liofilización del extracto

Tras liofilizar el extracto queda un sólido violeta dentro del matraz. Este tiene apariencia algodonosa y reticular como se puede apreciar en la *Figura 4.3*. Mantiene el color morado característico del extracto. Se queda poco compactado y es extremadamente higroscópico, por eso se conserva sellado con Parafilm. En el congelador aguanta muy bien, no hay pérdidas de color ni cambios en la apariencia. Sería interesante hacerle un espectro IR a ver qué saldría, aunque con lo higroscópico que es seguramente aparecería una banda característica del agua y no se sabe hasta qué punto se podría discernir de los OH^- que naturalmente posee la molécula.

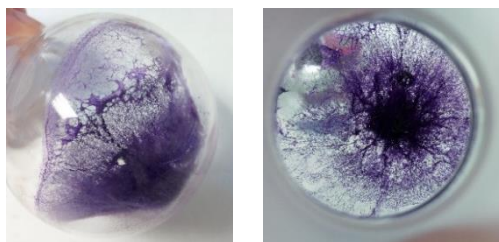


Figura 4.3

Extracto liofilizado. Vista lateral y cenital respectivamente.

4.4 Colores de las diferentes disoluciones de pH tamponado

Tras preparar las disoluciones tamponadas de extracto 1:1 (ver punto 3.3.4) los colores pasan del violeta que se ve en agua desionizada (pH en torno a 6) a los que se ven en la *Figura 4.4*. Se puede ver una amplia gama de colores desde un rojo/magenta a pH 2 hasta un amarillo intenso si se añade una disolución de sosa de pH 13 pasando por tonos violetas, azules y verdes.

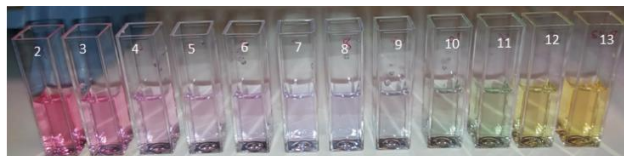


Figura 4.4 A

Disoluciones tampon de 1 ml de extracto + 1 ml de disolución amortiguadora al pH correspondiente.

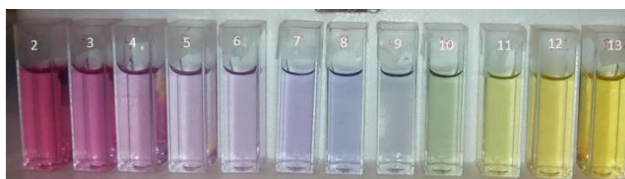


Figura 4.4 B

Disoluciones tampon de 2 ml de extracto + 1 ml de disolución amortiguadora al pH correspondiente.

Como para la proporción 1:1 no se visualizan claramente los colores, tras medir los espectros de absorción uv-vis se reforzaron todas las disoluciones con 1 ml más de extracto consiguiendo una proporción 2:1 las cuales se utilizan para determinar las coordenadas RGB de cada color a cada pH. También, se realizan los espectros de estas disoluciones reforzadas para ver si al añadir más indicador había cambios significativos en la longitud de onda a la que absorbían las disoluciones.

Los datos revelan que la longitud de onda en el visible no varía significativamente siendo la máxima variación 3 nm para pH 9. Por otro lado, para las longitudes de onda en el ultravioleta tampoco varían demasiado pero llega a haber cambios de hasta 5 nm que es un poco superior al caso del visible. Esto a la hora de desarrollar las tablas comparativas de colores del kit no es muy relevante puesto que el ojo humano no ve en el ultravioleta.

Los pHs superiores a 11 no dan absorción significativa en el visible, exclusivamente se encuentra que absorben de los 380 nm hasta unos 475 nm pero sin llegar a ser un máximo de absorción. El rojo de pHs muy ácidos sí posee un máximo en el visible muy bien definido. Se tomaron pHs entre 2 y 12 debido a que por debajo del pH 2 el tono rojo no cambia y por encima del 12 el tono amarillo tampoco cambia, ya que se hizo un pre-ensayo de extremos con clorhídrico a pH negativo y con sosa a pH 14.

Normalmente los espectros poseen dos longitudes de onda de absorción máxima, una cercana a los 380 nm que no varía mucho con el pH y otra que puede encontrarse entre los 500 y 600 nm que sí varía notablemente con el pH. Así, los datos de las longitudes de onda del máximo y su absorbancia obtenidos al realizar los espectros son los que se muestran en la *Tabla 4.1*.

pH	1 ml tampon + 1 ml extracto				1 ml tampon + 2 ml extracto ('reforzadas')			
	UV		Visible		UV		Visible	
	λ (nm)	A	λ (nm)	A	λ (nm)	A	λ (nm)	A
2	322	0,7899	524	0,5009	323	1,0393	525	0,6145
3	322	0,7941	529	0,2712	321	1,0506	529	0,3314
4	321	0,8042	536	0,1361	319	1,0653	537	0,1732
5	319	0,8042	547	0,0926	318	1,0638	548	0,1227
6	321	0,8103	555	0,1000	319	1,0681	554	0,1298
7	319	0,8088	574	0,1116	319	1,0811	575	0,1524
8	<u>322</u>	<u>0,8091</u>	581	0,1220	<u>319</u>	<u>1,0723</u>	583	0,1629
9	<u>340</u>	<u>0,7326</u>	582	0,1227	<u>335</u>	<u>0,9657</u>	585	0,1621
10	<u>373</u>	<u>1,0094</u>	595	0,1175	<u>372</u>	<u>1,3068</u>	597	0,1536
11	374	1,1881	602	0,0533	375	1,5569	602	0,0863
12	374	1,1853	-	-	374	1,5374	-	-

Tabla 4.1

Valores de longitud de onda del máximo de absorción y su correspondiente absorbancia para dos diluciones de extracto + tampon 1:1 y 2:1 a diferentes pHs

Respecto a ambas diluciones 1:1 y 2:1 se ve que hay un salto de 22 y 16 nm en las longitudes de onda del UV de pH 8 a pH 9 respectivamente con su correspondiente variación de absorbancia de -0,0765 unidades y de -0,1066 respectivamente y de unos 35 nm de pH 9 a pH 10 con una variación de absorbancia de 0,2768 unidades y de 0,3411 respectivamente, el resto de pHs se mantienen constantes. Se aprecia que las absorbancias correspondientes a los pHs 8, 9 y 10 experimentan de pH 8 a 9 una bajada y luego de 9 a 10 una subida mayor que la bajada tanto en las disoluciones reforzadas como en las no reforzadas.

En la zona de los pHs 8, 9 y 10 es donde se aprecia un cambio de comportamiento entre los pHs ácidos y los básicos, es como una zona de transición antes de la cual el comportamiento frente al UV se mantiene constante y después de la cual también se mantiene constante pero dentro de ella hay fluctuaciones.

Respecto al comportamiento en el espectro visible obtenemos una única longitud de onda con absorbancia máxima en este rango. Esta longitud de onda que define un solo color varía entre 500 y 600 nm pero siempre con una tendencia de desplazamiento casi lineal ($R^2 = 0,9802$) hacia mayores longitudes de onda, es decir, hacia el infrarrojo. Vemos que respecto a la absorbancia hay varias fluctuaciones: de pH 2 a pH 3 disminuye hasta casi la mitad, luego vuelve a disminuir a pH 4 hasta la mitad de la anterior, luego a pHs 5 y 6 no hay mucho cambio por lo que su intensidad es similar aunque su color realmente no lo sea. A partir de este pH se genera una especie de 'monte' donde las absorbancias pese a no variar mucho suben hasta alcanzar un pequeño máximo para luego volver a bajar y desplomarse hasta el valor 0.

Pero se ve que no hay diferencia significativa respecto a las longitudes de onda entre los espectros de las reforzadas y de las no reforzadas, solo varían en un aumento en las absorbancias que era lo que se esperaba encontrar, aunque este aumento es muchísimo más notable en la zona ultravioleta que en la visible.

Todos estos datos se ven mucho más claros si se representan la absorbancia frente al pH (Figura 4.5 A) y la longitud de onda frente al pH (Figura 4.5 B).

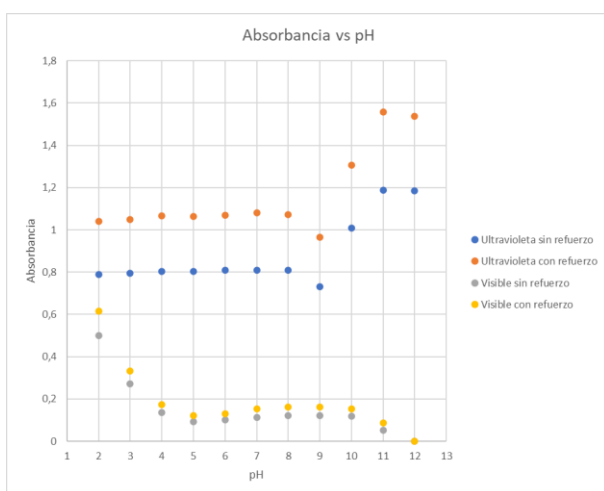


Figura 4.5 A

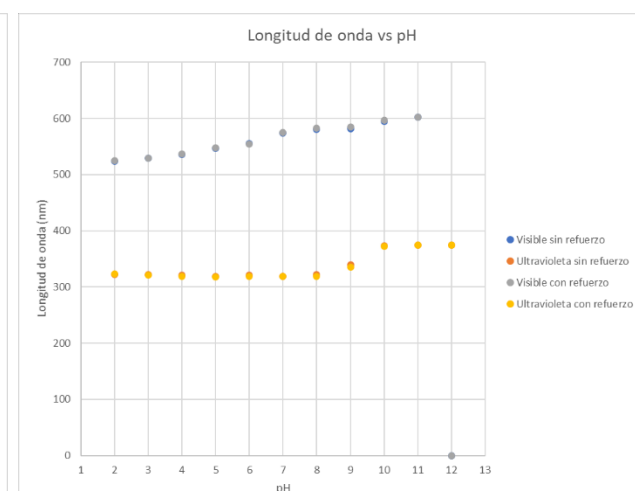


Figura 4.5 B

Finalmente, en la Figura 4.6 se pueden ver los espectros UV-Vis a los diferentes pHs tanto en 2D como en 3D en el cual se incluye la coordenada pH.

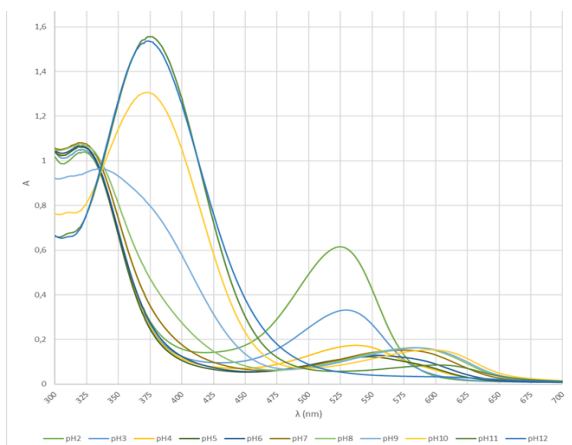


Figura 4.6 A
Espectro de absorción en 2D del extracto a diferentes pHs

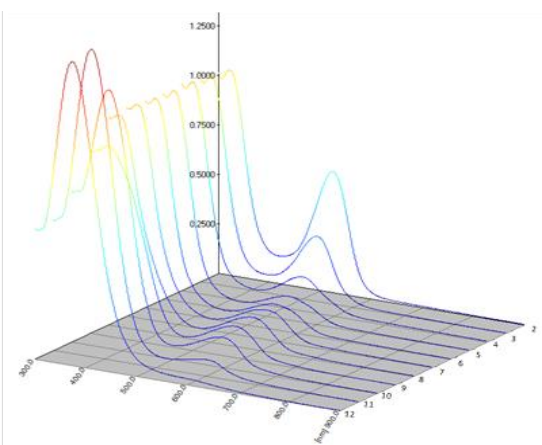


Figura 4.6 B
Espectro de absorción en 3D del extracto a diferentes pHs

Se ve claramente que a unos 334 nm se cortan todas las curvas. Estos cortes entre dos o más curvas pueden indicar la presencia de ‘puntos isobásticos’ característicos de formas químicas que se encuentran en equilibrio termodinámico.

Si se observa el círculo cromático de la *Figura 4.7* se ve que la longitud de onda de absorción comienza en 525 nm a pH 2 que corresponde a absorber el color verde, por lo que la disolución la vemos rojiza. Las longitudes de onda de absorción se desplazan hacia el rojo, por lo que se ven los correspondientes colores complementarios en las disoluciones: rosa, violeta y azul. El color amarillo se justifica porque a pHs básicos las disoluciones poseen alta absorbancia (> 1,4) en el visible de menor longitud de onda (entre unos 375 nm y 420 nm) que corresponde a absorber en el violeta y por ser su complementario el amarillo vemos este color. El color verde que se observa a pHs a partir de 9 que luego con el tiempo degrada a amarillo se podría justificar si se asume que la cinética de transformación de la especie azul (absorción en torno a 580 nm) a la amarilla es lo suficientemente lenta para que ambos colores se ‘mezclen’ y el conjunto se vea verde ya que para verlo verde de manera ‘pura’ la disolución debería absorber a más de 600 nm (absorción de rojo) y esto no se refleja en los datos. Cabe destacar que entre 380 nm y 420 nm todos los pHs absorben algo de radiación por lo que este color amarillo interferirá con el color resultante de absorber entre 500 y 600 nm haciéndose más intenso el efecto a medida que aumenta el pH, ya que a pHs ácidos la absorbancia en el amarillo es despreciable frente a la absorbancia de los otros colores.

Según *Violeta Rakić et al.*¹⁶ (ver Anexo 2) la cianidina experimenta diferentes reacciones pH-dependientes que podrían justificar el comportamiento observado. Como en todas estas reacciones se ven afectados los sistemas π -electrónicos también se ve afectada la interacción con la radiación y por ello se observan colores distintos para los diferentes pHs. Así, tras analizar sus datos se puede establecer que fundamentalmente encontramos tres formas coloreadas en el extracto: el catión flavilio predominante a pHs ácidos tanto si proviene de la cianidina como de la cianidina-3-O-B-glucopiranososa (Cy3Glc), las bases quinonoidales que están a pHs intermedios y las chalconas que pese a tener su absorción máxima en el UV está muy cercano al visible (375 nm) por lo que también presentan absorción aquí, sobre todo a pHs básicos junto con el posible dianión.

La mayoría de los datos encajan con la presencia de cianidina en nuestro extracto ya que a pH > 3,5 hay un cambio batocrómico de 524 nm a 560 nm que vemos en nuestro espectro a pHs de 2 hasta 6/7. Este cambio corresponde al equilibrio entre el catión flavilio y las bases quinonoidales. Que las bandas de absorción sean anchas indica que la cianidina parece estar presente en varios equilibrios de estructuras similares a estos pH. La ausencia de puntos isosbéticos bien definidos indican que a estos pHs en las disoluciones coexisten más de dos especies químicas.

En los rangos de pH un poco más alcalinos (8,2-9,3) hay un segundo cambio batocrómico con un cambio en la $\lambda_{\text{max-vis}}$ de 563 nm a 595 nm que también observamos en nuestro espectro también a pHs 8 y 9. A pHs < 8 la forma de las bandas UV es muy similar y cambia al pasar el pH a 9. Esto es debido a la formación de tautómeros prototrópicos cargados negativamente que vienen de las bases quinonoidales

En el rango de pH de 9,3 a 12,3 un tercer cambio batocrómico se observa donde la $\lambda_{\text{max-vis}}$ cambia de 595 nm a 612 nm que podría estar justificada con la formación de un dianión y en nuestro caso disminuye mucho la absorbancia hasta hacerse casi 0 a pH 12.

Aun así solo hay un dato que no se justifica: el de longitud de onda estabilizada a 375 nm a pHs alcalinos. Pero sí se justifica si atendemos al espectro de la Cy3Glc: en presencia de un sustituyente 3-glucosil la hidratación es más eficiente, lo que lleva a la formación de esta pseudobase carbinol y después a la formación de la forma chalcona que está apoyado por la aparición de su banda característica a 370 nm (en nuestro caso 375 nm). De 7,9 a 11 en pH hay un incremento significativo de la absorbancia de la banda a 370 nm ya que es una consecuencia de la transformación de la pseudobase carbinol incolora que se ha formado a bajos pHs que ahora pasa a la forma de chalcona neutra.

Estas disoluciones se guardan finalmente en la nevera envueltas en papel de aluminio individualmente para evitar que les llegue luz.

4.5 Fluorescencia a diferentes pHs

Ninguna de las cubetas de diferentes pHs se vio fluorescente al exponerla a una fuente de emisión ultravioleta de longitud de onda 360 nm ni 254 nm. Aunque *Violeta Rakić et al.*¹⁷ estudian más profundamente el comportamiento fluorescente del extracto a los diferentes pHs obteniendo resultados interesantes. Entre ellos que la cianidina exhibe fluorescencia a pH 5,5 con un máximo de intensidad a 310 nm y un segundo máximo a 615 nm (visible) pero que la excitación más efectiva cae en el UV y que para el derivado 3-glucosilado decrece la intensidad de emisión en el UV y desaparece en el visible.

4.6 Estabilidad del extracto a diferentes pHs respecto al tiempo

Una semana después de preparar las disoluciones del apartado 4.4 y medir su espectro se comparan para saber qué ocurre con el paso del tiempo. Esto se puede ver en las *Figuras 4.9* donde se ha colocado una imagen con flash y otra sin flash para poder visualizar mejor las disoluciones. Se encuentran ordenadas de izquierda a derecha en orden creciente de pH de 2 a 12.

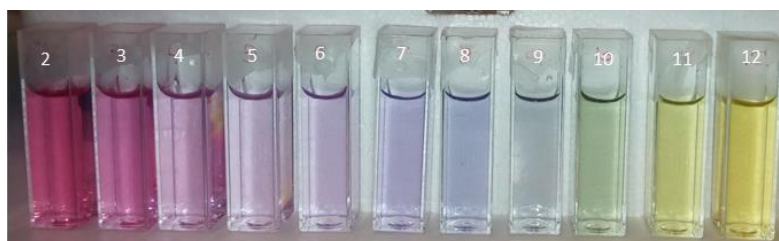


Figura 4.9 A Disoluciones t = 0



Figura 4.9 B Disoluciones t = 1 semana

Se observa que en general la sensación es de haber disminuido la intensidad de los colores iniciales, por otro lado a pH 9 el tono azulado ha degradado a verduzco y a pH 10 el tono verduzco ha degradado a amarillo.

Tras medir las absorbancias de las disoluciones reforzadas del apartado 4.4 al transcurrir una semana se obtienen los datos que se muestran en la *Tabla 4.2* cuya representación se ve en la *Figura 4.10* y al comparar los puntos con los de la *Tabla 4.1* se obtienen los gráficos reflejados en la *Figura 4.11* ('0' = inicial; '1' = una semana después).

pH	1 ml tampon + 2 ml extracto ('reforzadas') una semana antes				1 ml tampon + 2 ml extracto ('reforzadas')			
	UV		Visible		UV		Visible	
	λ (nm)	A	λ (nm)	A	λ (nm)	A	λ (nm)	A
2	323	1,0393	525	0,6145	323	1,0171	524	0,6673
3	321	1,0506	529	0,3314	322	1,0227	529	0,3403
4	319	1,0653	537	0,1732	321	1,0474	537	0,1723
5	318	1,0638	548	0,1227	322	1,0408	547	0,1190
6	319	1,0681	554	0,1298	319	1,0689	554	0,1454
7	319	1,0811	575	0,1524	319	1,0426	575	0,1433
8	319	1,0723	583	0,1629	319	1,0432	582	0,1525
9	335	0,9657	585	0,1621	327	0,9463	583	0,0854
10	372	1,3068	597	0,1536	356	1,0201	-	-
11	375	1,5569	602	0,0863	361	1,1116	-	-
12	374	1,5374	-	-	351	1,0527	-	-

Tabla 4.2

Datos de absorbancias y longitudes de onda de absorción máxima del extracto

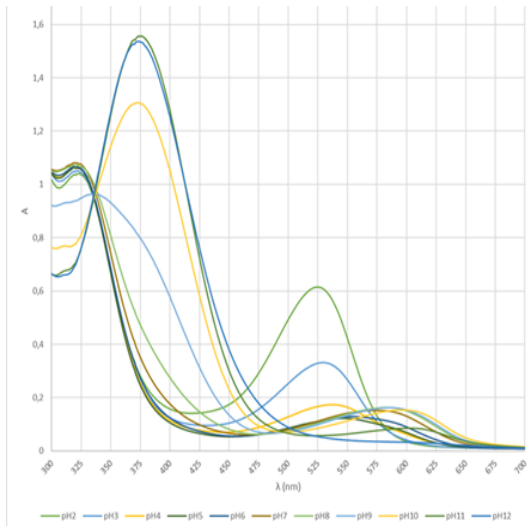
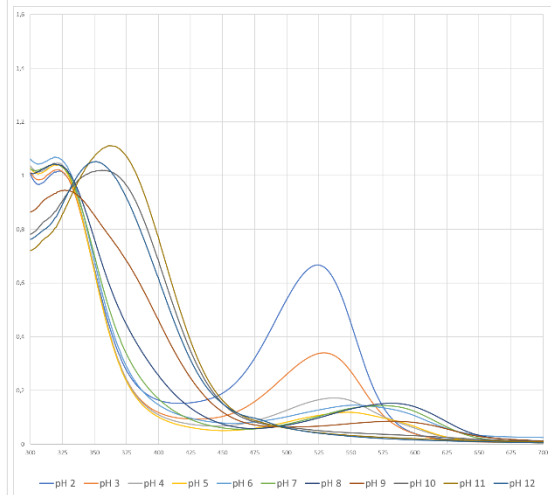


Figura 4.10 A Espectro del extracto a t = 0



No se dispone del espectro 3D
Figura 4.10 B Espectro del extracto a t = 1 semana

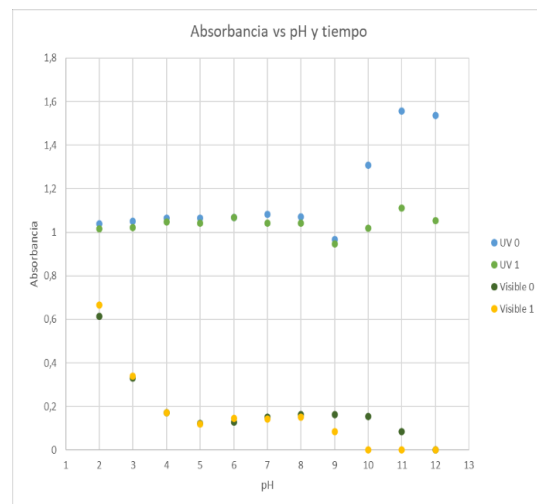
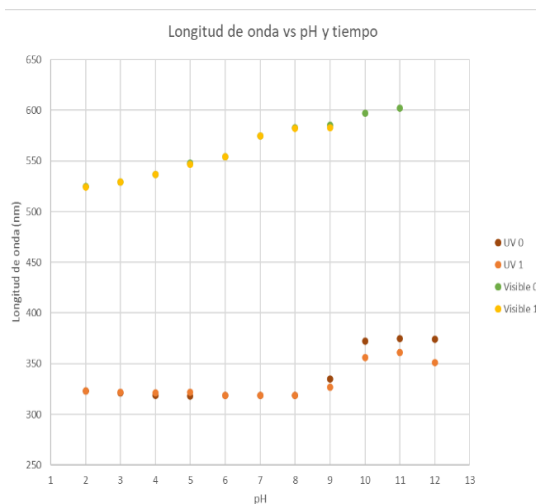


Figura 4.11

Se observa que a pH básicos la longitud de onda del visible desaparece por lo que solo se ven tonos amarillos correspondientes a la absorbancia 'residual' en el visible del máximo que se encuentra en el ultravioleta. Por otro lado, en los otros pHs no se observa una variación significativa de la longitud de onda después de una semana. Por otro lado, a pHs 4, 5 y 9-12 sí se observa una variación de la longitud de onda en el ultravioleta: 4 y 5 hacia ligeramente mayores longitudes de onda y de 9-12 hacia significativamente menores longitudes de onda, por eso aumenta el carácter amarillo con el paso del tiempo, viéndose el pH 9 más verde y menos azul.

En cuanto a la absorbancia se puede concluir que en el ultravioleta disminuye a todos los pHs salvo al 6 que se mantiene constante. Esta disminución es mucho más notable a pHs básicos (10-12) por eso palidece tanto el amarillo. En cuanto al visible la variación de absorbancia que se experimenta no es demasiada en la mayoría de los pHs, así aumenta la absorción a pH 2 viéndose un poco más intenso el color rojizo y en los pHs de 9-12 baja muchísimo la absorbancia; esto junto con la disminución de longitud de onda convergen en aumentar el carácter amarillo pero disminuir su intensidad, por eso se dice que los colores originales degradan al amarillo.

Este hecho probablemente sea debido a que la composición del extracto a pHs básicos (forma de chalcona) sea inestable frente al oxígeno¹⁸. Otros factores que se descartan son inestabilidad por la actividad enzimática del propio extracto ya que habiendo cocido las hojas lo más probable es que estas enzimas desnaturalicen; la temperatura, ya que se conservan en nevera; y la luz, ya que se conservan envueltas en papel de plata individualmente.

4.7 Adsorción del extracto sobre celulosa, comprobación de la reactividad al pH y estabilidad de los colores frente al tiempo

El ensayo de 'autosoprote' (punto 3.3.5) no dio resultados positivos ya que tras echar la gota de disolución tampon directamente sobre la hoja no se produjo ningún cambio de color. Se planteó esta idea debido a que mientras se lavaban los vasos de precipitados en la fregadera que habían contenido una disolución básica, parte de esta disolución cayó sobre unos trozos de hojas que previamente habían sido cocidos. Esto generó que el poco tono violeta que poseían cambiara a verde; tono característico de algunos pHs básicos, tal y como se muestra en la *Figura 4.12* adelantando algunos resultados que se encuentran más adelante en la adsorción en celulosa.



Figura 4.12 A
Hojas antes de cocerlas



Figura 4.12 B
Hojas después de cocerlas

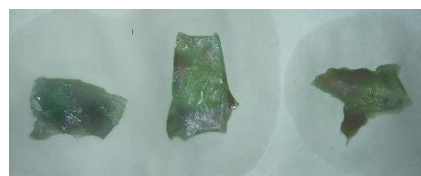


Figura 4.12 C
Hojas cocidas al ponerlas en contacto con pH básico

Pese a que no se sabe la masa exacta de extracto tomada se puede controlar cuánto pigmento se mezcla con la celulosa. Se puede medir la absorbancia de la disolución resultante al mezclar determinada cantidad de pigmento liofilizado con agua desionizada hasta un volumen (disolución K), si se ve que al medir esta absorbancia da demasiada intensidad de color se puede diluir hasta que la absorbancia resulte adecuada. En este caso, la absorbancia de la disolución K del extracto liofilizado en 5 ml de agua es de $0,6994 \cdot 4 = 2.7976$ a 553 nm (longitud de onda característica de absorción del extracto) ya que se realiza una dilución en la cubeta de acrílico de 1 ml de disolución K con 3 ml de agua desionizada cuya lectura de absorbancia es 0,6994 y que es la misma dilución que tenemos en el eppendorf con la celulosa (0,5:1,5 ó 1:3).



Figura 4.13
Extracto adsorbido en celulosa 3%

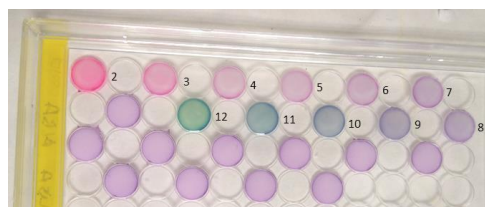


Figura 4.14
Comportamiento frente al pH del extracto adsorbido en celulosa 3%

En la *Figura 4.13* se ve el resultado tras secarse la placa. Se ve la tonalidad violeta característica del pigmento, aunque esta vez difuminado al blanco por la presencia de celulosa. También se ve que el pigmento suele migrar a los bordes del pocillo creando un aura, aunque está distribuido homogéneamente por el resto del pocillo.

Tras echar una gota de disolución de pH conocido y tamponado se obtienen los diferentes colores que se ven en la *Figura 4.14*.

Se ve que dan resultados positivos ya que cada pH tiene un color diferente, aunque por el contrario esta variación puede ser poco notable y fácilmente confundible. El número a la derecha del pocillo corresponde al pH adicionado. Los colores salen algo distintos a las disoluciones de diferentes pHs, sobre todo los pHs 9, 10, 11, 12 que ahora se ven azulados/verdosos y no amarillos; seguramente porque reaccionen más lentamente con el oxígeno que en disolución. Los pHs que dan colores débiles en la placa también son débiles en disolución (similitud) y los colores verdes correspondientes a pHs básicos en la placa se ven notablemente mejor que los colores amarillos en disolución (ventaja).

A la vista de los resultados yo hubiera repetido el experimento pero con una mayor concentración de extracto mezclado con la celulosa. Así, se podría hacer una optimización de la absorbancia del extracto y elegir aquella en donde los cambios de pH se vean mejor con el correspondiente cambio de color; buscando, como digo, la optimización.

Guardando esta placa en la nevera dentro de una bolsa hermética de plástico durante una semana se puede observar la falta de estabilidad de los colores iniciales, salvándose como mucho el de pH = 2 cuya forma predominante es el ion flavilio, que es muy estable. Esto es visible en la *Figura 4.15*.



Figura 4.15
Estado del extracto adsorbido en celulosa 3% tras una semana
(ver *Figura 4.14*)



Figura 4.16
Detalle de la placa. Celulosa descorchada.

Se ve que a medida que aumenta el pH de 2 a 6 el tono rosa/morado desaparece hasta blanco y que de 8 a 12 el tono se ha mantenido más amarillento a medida que aumenta el pH. Además, se aprecia cómo la lámina de celulosa se ha descorchado en la mayoría de los pocillos (todos salvo pH 2, 3 y 4, *Figura 4.16*).

Las antocianinas de la col lombarda tienen una excelente termoestabilidad debida a su alto grado de acilación en sus estructuras¹⁸, no se puede decir lo mismo cuando están expuestas al aire (oxígeno y luz).

Tras visualizar el estado de la placa al pasar una semana, se prueba a echar una gota de cada pH a los pocillos donde solo se había depositado extracto a ver si se recuperaba el color, es decir, donde no se había ensayado con disolución amortiguadora. Se ven como pocillos brillantes en la *Figura 4.17* y el número a su derecha corresponde al pH adicionado: se observa que en los pHs más básicos se torna de blanco a amarillento pero en un tono extremadamente pálido. Así que concluimos que no se recupera.

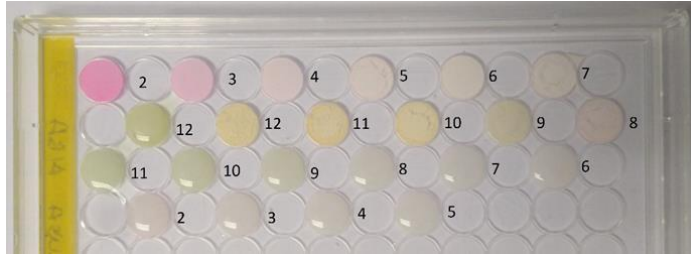


Figura 4.17

Comportamiento pasada una semana del extracto adsorbido en celulosa 3% al interaccionar con disoluciones amortiguadoras de diferente pH (los brillantes)

Una posible solución si se quisiera comercializar este formato de tiras reactivas podría ser añadir a la mezcla de celulosa y extracto un antioxidante, es decir, un componente suicida que se oxidara más fácilmente con el oxígeno que los pigmentos del extracto manteniendo en la medida de lo posible la integridad de estos. También, se podría probar a envolver al vacío cada una de las tiras reactivas con plástico de baja permeabilidad al oxígeno y abrir solo la que fuéramos a usar en ese momento.

4.8 Ensayo rédox

En el primer ensayo de pocillos se observa reacción solo al añadir en último lugar el peróxido de hidrógeno, sin ver reacción entre el extracto y la peroxidasa. Así, pasa de tener un tono violeta (pocillo de referencia) a tenerlo rojizo, cambio muy notable como se aprecia en la *Figura 4.18*. Esto significa que en presencia de peróxido el extracto se oxida, hecho que se ve acelerado al añadir la peroxidasa que reduce al peróxido de hidrógeno. La reacción que tienen lugar es:

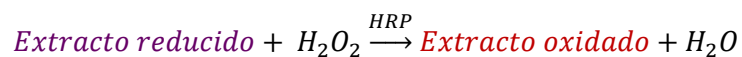


Figura 4.18

A la izquierda el extracto sin oxidar y a la derecha el extracto oxidado.

Al ver que el ensayo en la placa daba un resultado prometedor, se procedió a comprobar la hipótesis mediante un espectrofotómetro. Se observa que tras añadir la peroxidasa no hay variación en la longitud de onda de absorción del extracto a ese pH por lo que no hay reacción. No ocurre lo mismo al añadir a esta disolución el peróxido de hidrógeno, se observa un cambio inmediato de coloración, hecho que se comprueba al observar el espectro: la longitud de onda de absorción se ha desplazado de los 554 nm (color morado) a los 512 nm (visión de color rojo anaranjado). Con esto concluimos que en presencia de peróxido de hidrógeno y peroxidasa el sustrato se oxida cambiando de color. No se guardó el espectro así que en la *Figura 4.19* se adjunta una simulación de cómo se veía el espectro cinético.

Esto se sostiene si sabemos que estos pigmentos tienen capacidad antioxidante, como demuestran *Sheng Fang et al.*²⁵ en uno de sus estudios. En él concluyen que el extracto reducía significativamente el estrés oxidativo celular producido por el peróxido de hidrógeno en las células HepG2 y consecuentemente disminuía la apoptosis celular y mejoraba la viabilidad celular (ver Anexo 1) por lo que el extracto sí reacciona con el peróxido de hidrógeno, oxidándose en su caso apoyado con un cambio de fluorescencia del peróxido y en nuestro caso apoyado con el cambio de color del extracto.

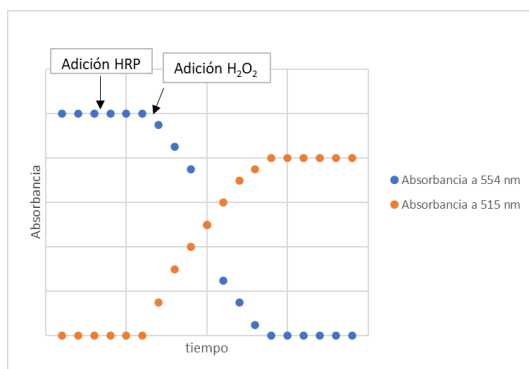


Figura 4.19

Simulación del espectro cinético de la reacción entre el extracto, la HRP y el peróxido de hidrógeno

Los resultados obtenidos en el ensayo de la GOx fueron inesperados. Lo que se quería saber era si se podría acoplar la reacción del extracto con el peróxido de hidrógeno a otra reacción enzimática para la identificación de su sustrato. Así al tener extracto, peroxidasa y GOx todo junto se podría identificar glucosa en muestras. Lo que se encuentra es que en el momento en que las dos enzimas (HRP y GOx) se hallaban juntas con el extracto, independientemente del orden en las que se añadían, este cambiaba de color al rojizo; hecho inesperado porque en ninguna se echaba glucosa la cual pudiera transformar la GOx y desprender H₂O₂ (este peróxido luego sería reducido por la peroxidasa oxidando al extracto y haciendo que cambie de color).



Figura 4.20

Arriba en morado disolución de tampón, extracto y GOx.

Abajo en rojo-anaranjado disolución de tampón, extracto, GOx y HRP.

La hipótesis es que en el propio extracto podría haber glucosa libre, hecho nada disparatado ya que hablamos de un vegetal cocido; o bien que las glucosas que se encontraban como sustituyentes en las formas aciladas de la cianidina pudieran actuar como sustrato de la GOx. La hipótesis que más me convence es la de que en el propio extracto pudiera haber glucosas libres ya que si pensamos en el centro activo de una enzima sabemos que está 'optimizado' al tamaño y geometría de su sustrato; por lo cual, que la cianidina con glucosa, que no es una molécula precisamente tan pequeña como la glucosa, pudiera entrar en la orientación adecuada para que la enzima catalizase su transformación me parece improbable. Como refuerzo a esta hipótesis tenemos que el carbono de la glucosa que puede unirse a la cianidina es el mismo que sufre la reacción de oxidación con GOx por lo que si está unida a la cianidina ese carbono está inaccesible. En la Figura 4.21 se pone la reacción que sufre la glucosa en presencia de GOx y a su derecha la cianidina 3-glucosa donde se ve que el carbono inaccesible es el mismo sobre el que actúa la GOx.

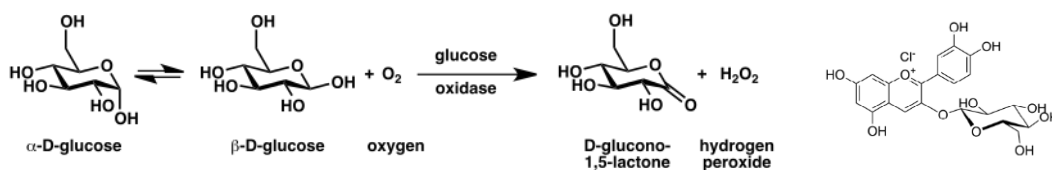


Figura 4.21.

Reacción entre la GOx y la B-D-glucosa.

Cianidina 3-glucosa

La intención era seguir probando con otras enzimas que desprendieran peróxido de hidrógeno y si salían resultados positivos probar también la inmovilización en tiras reactivas, pudiendo converger ambas identificaciones (pH y sustrato 'X') en una misma tira, pero el inicio de la pandemia lo paralizó todo. Como se ve, las antocianinas se podrían usar como pigmentos alternativos a los comercializados actualmente en reacciones enzimáticas.

4.9 Desarrollo del material gráfico

Con la herramienta 'cuentagotas' de Publisher se sacaron las coordenadas RGB del color de cada disolución y pocillo a cada pH para realizar las tablas de comparación. Con estas coordenadas y Excel, coloreé cada casilla individualmente y a mano con el mismo color RGB pero con una variación entre sí de 5 unidades de luminosidad en la escala HSL para simular un extracto cada vez más diluido, quedando tal y como se muestra en la *Figura 4.22*; pudiendo ahora copiar exactamente ese mismo color a las casillas de la tabla de comparación final en Publisher, la que vendría en la caja del kit. Cabe destacar que en estas etapas de transformación de colores es muy probable que se pierda mucha información por el camino ya que, por ejemplo, la misma foto tratada con 'ColorGrab' me daba unas coordenadas RGB distintas a la misma foto tratada con Publisher y aun así no era el mismo color que mi ojo veía, supongo que porque mi ojo interpreta no un pixel sino un conjunto integrado. Así que las tablas habría que revisarlas manualmente una vez impresas para obtener el color más fidedigno a la disolución.

Los espacios entre pHs son para colocar el frasco con la muestra y el extracto y poder comparar mejor. Para muestras con color natural (pero lo suficientemente transparentes) se deberá tener dos frascos, uno de los cuales solo contendrá muestra y el otro contendrá muestra + extracto, así con el que lleve solo muestra se deberá mirar a través la tabla haciendo coincidir el color observado a través con el que posee la muestra con extracto.

Para hacer las diferentes cajas se usa la herramienta www.templatemaker.nl y se piensa las dimensiones óptimas para que la caja quepa en un A4 y en su defecto en un A3 como límite. Estas plantillas se editan con Publisher y se pueden ver en el Anexo 3.

	≤2																								
HSL	249,255,151	156	161	166	171	176	181	186	191	196	201	206	211	216	221	226									
	3																								
HSL	241,255,157	162	167	172	177	182	187	192	197	202	207	212	217	222	227	232									
	4																								
HSL	213,255,157	162	167	172	177	182	187	192	197	202	207	212	217	222	227	232									
	5																								
HSL	213,255,121	126	131	136	141	146	151	156	161	166	171	176	181	186	191	196									
	6																								
HSL	213,255,115	120	125	130	135	140	145	150	155	160	165	170	175	180	185	190									
	7																								
HSL	195,255,171	176	181	186	191	196	201	206	211	216	221	226	231	236	241	246									
	8																								
HSL	181,228,171	176	181	186	191	196	201	206	211	216	221	226	231	236	241	246									
	9																								
HSL	174,22,144	149	154	159	164	169	174	179	184	189	194	199	204	209	214	219									
	10																								
HSL	87,29,157	162	167	172	177	182	187	192	197	202	207	212	217	222	227	232									
	11																								
HSL	106,128,92	97	102	107	112	117	122	127	132	137	142	147	152	157	162	167									
	12																								
HSL	54,255,123	128	133	138	143	148	153	158	163	168	173	178	183	188	193	198									
	>12																								
HSL	40,247,128	133	138	143	148	153	158	163	168	173	178	183	188	193	198	203									

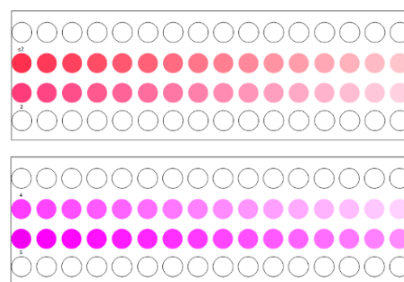


Figura 4.22

pH y su correspondiente color en coordenadas HSL y las tablas de comparación que aparecen en las cajas de los kits.

5. CONCLUSIONES

Para empezar, se concluye que es posible visualizar las paredes de las células de las hojas de la col lombarda con pigmento Rojo Congo; vemos diferencias entre otras células como las de la epidermis de la cebolla, las cuales se encuentran distribuidas más regularmente que las de la col. No se visualizaron los núcleos ni otros orgánulos ya que las hojas se hallaban cocidas y solo permaneció la pared celular.

Por otro lado, si comparamos la extracción por cocción en agua con la extracción por ultrasonidos se encuentra que la cocción es adecuada y asumible ya que el rendimiento de extracción es superior que con ultrasonidos y no altera las propiedades de los pigmentos. Además, tras la primera extracción por cocción no quedaba mucho más pigmento para extraer secuencialmente así que en términos absolutos la técnica de cocción da rendimientos de extracción elevados. Con esto apreciamos su alta solubilidad en agua debido a la polaridad de la(s) molécula(s) que conforma(n) el extracto.

Además, se observa que el pigmento es altamente higroscópico ya que para una masa no muy elevada de pigmento tarda 24h en liofilizarse y en cuanto entra en contacto con la humedad ambiente obtiene una textura chiclosa.

En cuanto a las propiedades químico-físicas de los pigmentos se concluye que tienen propiedades ácido-base que le confieren diferentes longitudes de onda de absorción y absorbancias a pHs comprendidos entre 2 y 12 unidades. Esto es debido a reacciones de protonación, hidratación, isomerización y formación de enlaces hemiacetales intramoleculares.

También, se observa que la estabilidad de la disolución del extracto es susceptible a factores como la cinética de transformación de una especie en otra. Por ello con el paso del tiempo las disoluciones, generalmente básicas, cambian tanto su longitud de onda de absorción como la absorbancia a las diferentes longitudes de onda degradándose al amarillo. También sucede, aunque de forma mucho más rápida, si se deposita el extracto en celulosa quedando completamente incoloro/amarillento con el paso del tiempo sin poderse recuperar. No ocurre lo mismo si llevamos ese extracto depositado en celulosa a pH 2 o 3 ya que el color permanece. Ninguna de las disoluciones a diferentes pHs aparentemente presenta fluorescencia.

Así, la deposición del extracto sobre celulosa dio resultados prometedores pero la prueba de autosuporte de la hoja dio negativa ya que al echar sobre la hoja diferentes pHs no permea y no cambia de color. No ocurre lo mismo cuando se pone en contacto la disolución de pH en un corte realizado sobre la hoja, ya que ahí puede acceder al pigmento y cambiar de color.

En cuanto a su comportamiento redox se concluye que los pigmentos pueden oxidarse cambiando su longitud de onda de absorción si se hallan en presencia de un oxidante como pueda ser el peróxido de hidrógeno, viéndose acelerado el proceso en presencia de peroxidasa. Esto se puede acoplar a otras reacciones enzimáticas que desprendan peróxido de hidrógeno.

Con toda esta información se concluye que es viable desarrollar un kit colorimétrico de pH basado en el extracto violeta de la col lombarda así como utilizarlo para reacciones redox enzimáticas. En este caso se desarrollan tres formatos, solo uno de los cuales estará destinado a la colorimetría ácido-base y redox simultáneamente (el formato 'tiras'). Para terminar de asentar el método sería necesario repetir el proceso entero de extracción de los pigmentos varias veces tal y como se pide en las instrucciones del kit para asegurar la reproducibilidad del método.

Así también facilitaría la optimización de las tablas comparativas ya que las pantallas funcionan en RGB y las impresoras en CMYK por lo que el color visto en la pantalla puede no coincidir con el color impreso. También sería adecuado experimentar para determinar la sensibilidad del método, es decir, qué variación de pHs se puede detectar y ensayarlo también en muestras reales de pH conocido. Además, para el formato tiras rédox sería necesario también establecer el límite de detección del sustrato en cuestión y reflejar esta información en la caja (en el prototipo se pone el ejemplo de detección de glucosa > 1 ppm) pudiéndose ensayar con muchas otras enzimas y sus correspondientes sustratos.

Las herramientas informáticas Excel, Publisher y ColorGrab han resultado ser de gran ayuda en la maquetación artística del producto final quedando así reflejada la gran laboriosidad del proyecto.

6. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

1. Hablemos de alimentos.
<https://hablemosdealimentos.com/wp-content/uploads/2018/05/col-lombarda-1.jpg>
(acceso agosto 2020)
2. Productos con tradición.
<https://www.productoscontradicion.es/wp-content/uploads/2020/05/COL-MORADA.jpg> (acceso agosto 2020)
3. Jardinitis.
<https://media.jardinitis.com/product/plantel-de-col-lombarda-eco-m-105-800x800.jpeg> (acceso agosto 2020)
4. Wikipedia. La enciclopedia libre. Brassica oleracea.
https://es.wikipedia.org/wiki/Brassica_oleracea_var._capitata_f._rubra (acceso agosto 2020)
5. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Pigmentos en los alimentos.
http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/acym/Pigmentos_en_alimentos.pdf(acceso agosto 2020)
6. Wikipedia. La enciclopedia libre. Clorofila.
<https://es.wikipedia.org/wiki/Clorofila> (acceso agosto 2020)
7. Wikimedia. Espectro de la clorofila.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Chlorophyll_ab_spectra-es.svg
(acceso agosto 2020)
8. Wikipedia. La enciclopedia libre. Antocianina.
<https://es.wikipedia.org/wiki/Antocianina> (acceso agosto 2020)
9. Wikimedia. Numeración y estructura de la Flavona.
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flavon_num.svg (acceso agosto 2020)

10. Chen, Y.; Wang, Z.; Zhang, H.; Liu, Y.; Zhang, S.; Meng, Q.; Liu, W. Isolation of High Purity Anthocyanin Monomers from Red Cabbage with Recycling Preparative Liquid Chromatography and Their Photostability. *MDPI* **2018**, *Molecules* **23**, 991; DOI: 10.3390/molecules23050991.
11. Munmai, A.; Somsook, E.; The Determination of the pK_a of Red Cabbage Anthocyanin by the Spectrometric Method and Nonlinear Curve Fitting. *Chem. Educator* **2011**, *16*, 1-3; DOI: 10.1333/s00897112404a.
12. Wikipedia. La enciclopedia libre. Estructura de las antocianinas.
<https://es.wikipedia.org/wiki/Antocianina#/media/Archivo:Anthocyanidins.svg> (acceso agosto 2020)
13. Wikimedia. Cation Flavilio.
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/ff/Flavylium_cation.svg/1024px-Flavylium_cation.svg.png (acceso agosto 2020)
14. Rakić, V. P.; Skrt, M. A.; Miljković, M. N.; Kostić, D. A.; Sokolović, D. T.; Poklar Ulrih, N. E. Effects of pH on the stability of cyanidin and cyanidin 3-O-β-glucopyranoside in aqueous solution. *Hem. Ind.* **2015** *69* (5), 511-522; DOI: 10.2298/HEMIND140711072R.
15. Chen, Y.; Wang, Z.; Zhang, H.; Liu, Y.; Zhang, S.; Meng, Q.; Liu, W. Isolation of High Purity Anthocyanin Monomers from Red Cabbage with Recycling Preparative Liquid Chromatography and Their Photostability. *Molecules* **2018**, *23*, 991; DOI: 10.3390/molecules23050991.
16. Rakić, V.; Rinnan, Å.; Polak, T.; Skrt, M.; Miljković, M.; Poklar Ulrih, N. pH-induced structural forms of cyanidin and cyanidin 3-O-β-glucopyranoside. *Elsevier* **2019**, *Dyes and Pigments* **165** (2019) 71-80.
17. Rakić, V. P.; Ota, A. M.; Skrt, M. A.; Miljković, M. N.; Kostić, D. A.; Sokolović, D. T.; Poklar Ulrih, N. E. Investigation of fluorescence properties of cyanidin and cyanidin 3-O-β-glucopyranoside. *Hem. Ind.* **2015**, *69* (2), 155-163; DOI: 10.2298/HEMIND140203030R.
18. Fang, S.; Lin, F.; Qu, D.; Liang, X.; Wang, L.; Characterization of Purified Red Cabbage Anthocyanins: Improvement in HPLC Separation and Protective Effect against H₂O₂-Induced Oxidative Stress in HepG2 Cells. *Molecules* **2019**, *24*, 124; DOI: 10.3390/molecules24010124.

7. ANEXO 1. Perfil de las antocianinas y capacidad antioxidante.

En el artículo ‘Caracterización de las antocianinas purificadas de la col lombarda: mejora en la separación HPLC y efecto protector contra el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ en las células HepG2’ Sheng Fang y su equipo estudian las diferentes moléculas que componen el extracto de la col lombarda separadas por HPLC en fase reversa. Encuentran que la resolución de los picos mejora si la temperatura de la columna aumenta de 20°C a 45°C ya que debido a las estructuras similares que presentan normalmente coelúan en una columna HPLC C18, lo que hacía difícil su separación. Normalmente estas separaciones no tenían en cuenta la temperatura pero se ve que es una variable importante. Así, basadas en estas condiciones optimizadas determinaron la composición del extracto mediante HPLC-ESI-MS, encontraron 13 picos (en otros artículos llegan a encontrar hasta 20) los cuales en base a su tiempo de retención y el espectro de masas identifican comparando con la bibliografía disponible. Encuentran que los derivados de cianidina suelen tener en posición 5 una glucosa y en posición 3 una diglucosa (diglucósido) que suele estar un 19 % sin acilar, 31 % diacilada y 51 % monoacilada con los ácidos ferúlico, sinápico, para-cumárico y cafeico, estas antocianinas aciladas presentan buena estabilidad a la luz y el calor en comparación con las que no están aciladas.

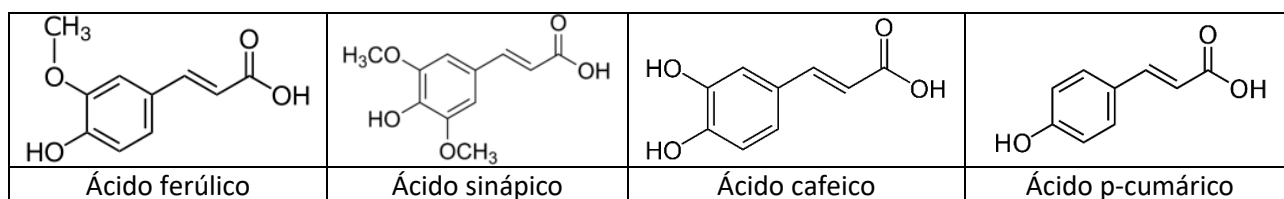


Table 2. Identification of each anthocyanins in the RCA extracts by HPLC-ESI-MS.

Peak	t _R /min	M ⁺ m/z	Tentative Identification
1	6.14	773	Cyanidin-3-diglucoside-5-glucoside
2	8.14	979	Cyanidin-3-(sinapoyl)-diglucoside-5-glucoside
3	11.12	1081	Cyanidin-3-(caffeoyl)(p-coumaroyl)-diglucosides-5-glucoside
4	11.67	1111	Cyanidin-3-(feruloyl)-triglucosides-5-glucoside
5	12.39	1141	Cyanidin-3-(sinapoyl)-triglucoside-5-glucoside
6	14.39	1287	Cyanidin-3-(feruloyl)(feruloyl)-triglucoside-5-glucoside
7	15.29	1317	Cyanidin-3-(feruloyl)(sinapoyl)-triglucoside-5-glucoside
8	16.11	935	Cyanidin-3-(caffeoyl)-diglucoside-5-glucoside
9	19.73	919	Cyanidin-3-(p-coumaroyl)-diglucoside-5-glucoside
10	20.45	949	Cyanidin-3-(feruloyl)-diglucoside-5-glucoside
11	22.88	1125	Cyanidin-3-(feruloyl)(feruloyl)-diglucoside-5-glucoside
12	23.42	1155	Cyanidin-3-(feruloyl)(sinapoyl)-diglucoside-5-glucoside
13	23.78	1185	Cyanidin-3-(sinapoyl)(sinapoyl)-diglucoside-5-glucoside



Figure 2. The anthocyanins contents and profiles of the RCA extracts.

Estas proporciones pueden cambiar con la variedad, tiempo de maduración y las condiciones de cultivo.

Por otro lado, determinan simultáneamente los efectos de las antocianinas de la col lombarda sobre la viabilidad celular y sobre los niveles de ROS en células HepG2 tratadas con peróxido de hidrógeno. Estas células pertenecen a una línea de carcinoma humano hepatocelular. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales están implicadas en la etiología de varias enfermedades crónicas, son una serie de subproductos metabólicos que están relacionados con procesos patológicos y degenerativos en el cuerpo humano. La actividad antioxidante del extracto siempre había sido determinada por métodos químicos como los ensayos DPPH y ABTS lo que presenta esta vez un punto en innovación. Para llevar a cabo este ensayo tratan a cuatro grupos de células, uno exclusivamente con peróxido de hidrógeno a 0,5 $\mu\text{mol/ml}$ 'model', y los otros tres además también con concentraciones crecientes de antocianinas de la col lombarda de 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml y 1,5 mg/ml; además del no tratado 'control'.

Si se compara el grupo modelo con el grupo control a través de imágenes fluorescentes se observa que el tratamiento con peróxido aumenta el nivel de ROS, esto es así debido a que el peróxido de hidrógeno atraviesa fácilmente la bicapa de las membranas, esto inicia la reacción de Fenton con iones metálicos que forman radicales hidroxilo extremadamente tóxicos, por lo que causan estrés oxidativo.

Al añadir las antocianinas del extracto se observa una disminución del nivel de intensidad fluorescente de los ROS por lo que la adición de todas las concentraciones de antocianos disminuyen los valores de ROS en las células HepG2. La concentración que parece ser la óptima es la de 1 mg/ml que corresponde a tener 0,21 mg/ml de antocianinas.

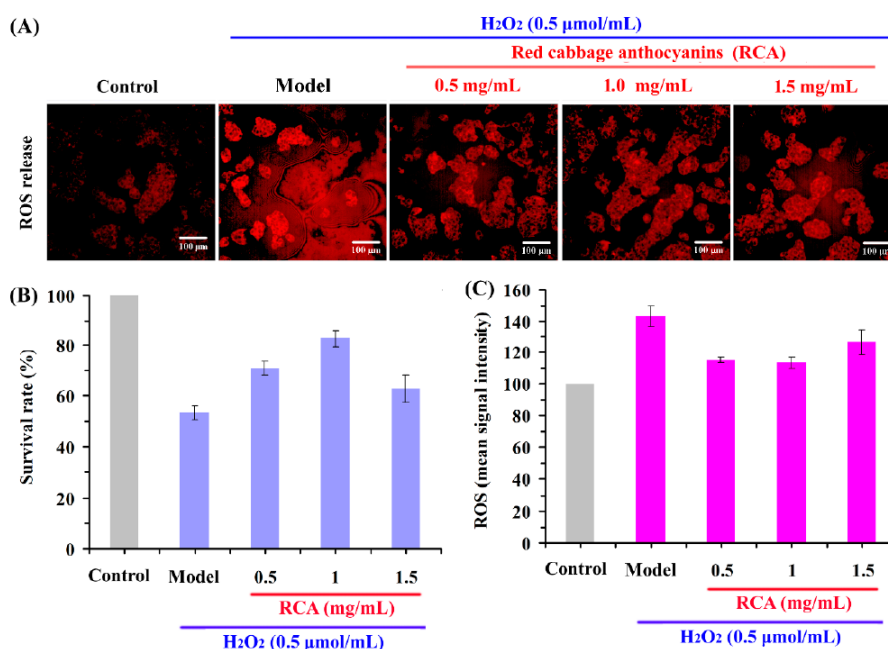


Figure 3. The protective effects of the RCAs against H₂O₂-induced HepG2 cell antioxidant damage ((A) fluorescence image; (B,C) fluorescence data analysis).

El efecto protector de las antocianinas se relaciona con su efecto antioxidante mediante la activación de rutas metabólicas concretas que refuerzan la respuesta antioxidante; por ejemplo, aumentando la actividad enzimática antioxidante protegiendo la función mitocondrial. Así, disminuye la apoptosis celular y mejoran la viabilidad celular.

8. ANEXO 2. Formas estructurales inducidas por el pH.

En el artículo ‘Formas estructurales de la cianidina y la cianidina-3-O-β-glucopiranososa inducidas por el pH’ Violeta Rakić y su equipo investigan las diferentes formas químicas que pueden adoptar la cianidina y la cianidina-3-O-β-glucopiranososa cuando se ven sometidas al cambio de pH en el medio en el que se encuentran. Para ello realizan medidas espectrofotométricas de cada disolución de sustancia a diferentes pH para intentar entender qué pasa al mirar las longitudes de onda de absorción y la absorbancia a esas longitudes de onda.

Las investigaciones espectrales revelaron la coexistencia de varias formas como el catión flavilio (AH^+), la base quinonoidal (A), dos pseudobases carbinol y la chalcona. El equilibrio entre estas tres formas es altamente dependiente del pH y excepto para la isomerización cis/trans de la chalcona todas esas conversiones son completamente reversibles por lo que dependiendo del pH del medio se encontrará predominante una de ellas. A $pH < 2$ las antocianinas se ven rojas-anaranjadas debido al catión flavilio, el cual tiene un sistema π -electrónico característico y por lo tanto expresa absorción electrónica en la región visible.

8.1 Análisis espectrofotométrico

8.1.1 Cianidina

En el estudio espectral pH-dependiente de la cianidina encuentran que a $pHs < 3,5$ la intensidad de absorción de la cianidina debido a su núcleo de catión flavilio a 520 nm decrece notablemente, lo que indica la transformación de este catión flavilio en la pseudobase carbinol incolora y la especie quinonoidal coloreada.

Para $pH > 3,5$ hay un cambio en las bandas espectrales, o cambio batocrómico, en la longitud de onda de absorción máxima en el rango visible para la cianidina que va de 524 nm a 560 nm (**esto me pasa a nuestro extracto**). Este cambio corresponde al equilibrio entre el catión flavilio y las bases quinonoidales con un pK_a de 4,3 ($\pm 0,2$). Que la banda de absorción sea ancha indica que la cianidina parece estar presente en varios equilibrios de estructuras similares a este pH. En las reacciones de transferencia de protones controladas por difusión los protones son transferidos desde los grupos hidroxil de los carbonos 3, 5, 7, 3' y 4' de la cianidina a moléculas de agua. La banda con $\lambda_{max-vis}$ cerca de 520 nm corresponde al catión flavilio que desaparece a estos $pHs > 3,5$; también hay un cambio en el rango ultravioleta que va de una λ_{max-uv} de 270 nm a 283 nm la cual se asigna a la pseudobase carbinol. Todo esto indica que a estos pHs también se forman la pseudobase carbinol que no posee color y la base quinonoidal coloreada todo a ello a expensas del catión flavilio. El equilibrio de esta reacción ocurre más lentamente que la transferencia de protones.

En ausencia de un sustituyente glucosilado en posición 3 la hidratación es menos eficiente y la pseudobase carbinol solo se forma a $pHs > 4$ hasta 5. La ausencia de puntos isobésticos bien definidos entre los pHs 0,4 y 5,5 indican que a esos pHs en las disoluciones más de dos especies químicas.

En el rango de pH 5,5-8,2 la banda con λ_{max-uv} cerca de los 360 nm corresponde a la chalcona neutra. **No se observa en nuestro extracto absorción máxima a 360 nm**. A medida que el pH aumenta, la absorción a 280 nm disminuye (asignada a la pseudobase carbinol) lo que indica su transformación a la forma chalcona a través de una reacción de tautomerización de apertura de

anillo catalizada por una base. La chalcona de anillo abierto no absorbe luz en el rango visible. En ausencia de una sustitución glucosídica en posición 3 el equilibrio entre la pseudobase carbinol y la forma de chalcona está casi completamente desplazado hacia la forma de chalcona abierta. **Solemos tener una absorción a longitudes de onda mayores 375-410 nm que sí cae en el visible y se ve amarillo.**

En los rangos de pH más alcalinos (8,2-9,3) hay un segundo cambio batocrómico en el espectro de la cianidina con un cambio en la $\lambda_{\text{max-vis}}$ de 563 nm a 595 nm (**esto también le pasa a nuestro extracto**). Esto revela el segundo pKa a 8,8 ($\pm 0,2$) con la formación de tautómeros prototrópicos cargados negativamente de las bases quinonoidales (A^-) que contribuyen al color en este rango de pH por ser especies altamente conjugadas. En esta región hay una banda a 360 nm lo que indica la detección de la chalcona aunque sin cambios en la absorbancia. **En nuestro caso también se observa, igual que la absorbancia decae muy rápidamente hasta casi anularse a pH 12.**

En el rango de pH de 9,3 a 12,3 un tercer cambio batocrómico se observa donde la $\lambda_{\text{max-vis}}$ cambia de 595 nm a 612 nm. Ellas creen que hay un tercer pKa con una forma de dianión (A^{2-}) causado por la pérdida de un tercer protón debido a la alta alcalinidad del medio así como observan una bajada en la absorbancia. **a nosotros también nos pasa igual que la absorbancia decae muy rápidamente hasta casi anularse a pH 12.**

En el rango de 11,5 – 12,5 unidades de pH, sigue bajando la absorbancia en el rango visible y también hay cambio en la ventana del UV pasando de tener una banda a 360 nm a otra a 320 nm lo que intentan justificar con la transformación de una chalcona neutra en una ionizada. **Esto no lo observamos ya que nuestras bandas se quedan muy estabilizadas en 375 nm.**

8.1.2 Cianidina 3-O- β -glucopiranososa (Cy3Glc, Cy3)

De forma similar a la cianidina a los pHs más bajos la banda de absorción del espectro visible de la Cy3Glc es estrecha y sigue correspondiendo al catión flavilio. Entre los pHs 0,8 y 3,7 la longitud de onda del máximo de absorción es 511 nm. A estos pHs la Cy3 tiene una banda en el UV a 280 nm como el máximo y hay una diferencia en las absorptividades molares de la cianidina y la Cy3 lo que indica que la glucosilación en posición 3 genera un gran impacto al aumentar la absorptividad molar de la molécula.

A pHs > 2,5 hay una disminución en la absorptividad molar de la Cy3 lo que refleja la transformación del catión flavilio coloreado en la pseudobase carbinol incolora debida a la adición nucleófila de agua. Comparando el espectro a pH 4,4 con el espectro del catión flavilio a pH 0,4 se ve que la Cy3 se encuentra en una forma incolora a pH > 4,4 ya que hay una banda de absorción a 280 nm que es característica de la pseudobase carbinol, así, en presencia de un sustituyente 3-glucosil la hidratación es más eficiente lo que lleva a la formación de esta pseudobase carbinol y después a la formación de la forma chalcona que está apoyado por la aparición de su banda característica a 370 nm. **Esto se parece más a lo que observamos en los espectros a 375 nm.**

A los pHs de 4,5 a 8 hay un cambio batocrómico para la Cy3 tanto en el rango visible como UV donde la absorción máxima se desplaza de 514 a 568 nm **datos que no obtenemos nosotros.** Esto indica que al cambiar el pH de 4 a 7 aparecen dos pKa uno a 5,2 y otro a 6,8 ($\pm 0,2$) que corresponden a la desprotonación de pequeñas cantidades residuales de catión flavilio para

formar las bases quinonoidales y quizás en medio alcalino la formación del anión quinonoidal por desprotonación ya que la banda característica del catión flavilio desaparece a $\text{pH} > 4,4$.

A medida que el pH aumenta la banda de absorción a 280 nm disminuye, lo que es característico de la pseudobase carbinol. Al comparar estos espectros con los del catión flavilio a $\text{pH} 0,4$ se ve que en el rango de 4,4 a 7,9 unidades de pH la Cy3 existe en la forma incolora de pseudobase carbinol y chalcona. A $\text{pH} 7,5$ una banda con un máximo en 370 nm aparece la cual es característica de la chalcona de anillo abierto.

De 7,9 a 11 en pH hay un incremento significativo de la absorbancia de la banda a 370 nm ya que es una consecuencia de la transformación de la pseudobase carbinol incolora que se ha formado a bajos pH s que ahora pasa a la forma de chalcona neutra. **Esto lo observamos pero a 375 nm.**

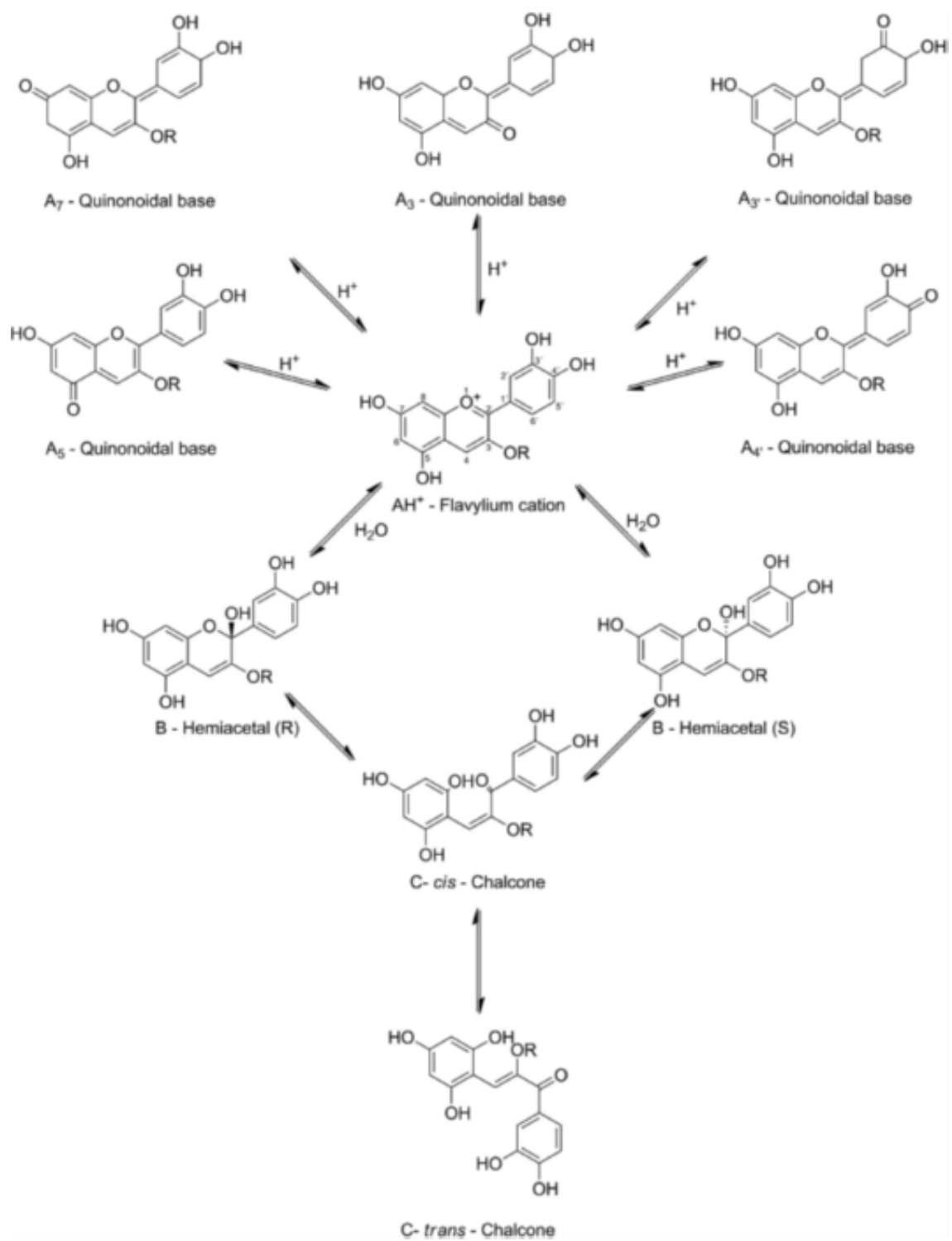
Sus datos espectroscópicos revelan que la glucosilación de la cianidina tiene diferentes efectos en los diferentes rangos de pH : a $\text{pH} < 4$ la glucosilación en posición 3 resulta en un elevado efecto hipercrómico, a $\text{pH} > 4$ la presencia del grupo 3-glucosil favorece las reacciones de hidratación lo que genera un elevado efecto hipocrómico causado por la formación de formas incoloras (como la pseudobase carbinol). Además, la presencia de este grupo glucosil hace que los valores de pK_a se desplacen hacia valores más altos de pH por lo que como consecuencia la Cy3Glc no experimenta una banda característica del dianión quinonoidal que sí se encuentra en el espectro de la cianidina.

8.2 Análisis multivariante

A través del análisis de datos multivariante encuentran siete formas estructurales diferentes para la cianidina y seis para la Cy3Glc. La forma que no se ha encontrado para la Cy3Glc es la de dianión quinonoidal lo que tampoco se reflejaba en el estudio espectroscópico. Gracias al análisis multivariante establecen que muchas de las bandas que se ven espectroscópicamente son el resultado de la superposición de otras lo que influye en la forma, posición e intensidad de estas medidas. Debido a la coexistencia de numerosas formas estructurales al mismo pH es difícil observar la aparición y desaparición de ciertas formas por espectrometría.

8.3 Estabilidad de la Cy y Cy3Glc

La cianidina muestra mayor estabilidad a $\text{pH} 7$, menor a 4 y a $\text{pH} 2$ y 9 es inestable mientras que la estabilidad de la cianidina-3-O-B-glucopiranososa incrementa a medida que baja el pH ya que es la más estable a $\text{pH} 2$ y la más inestable a $\text{pH} 9$.

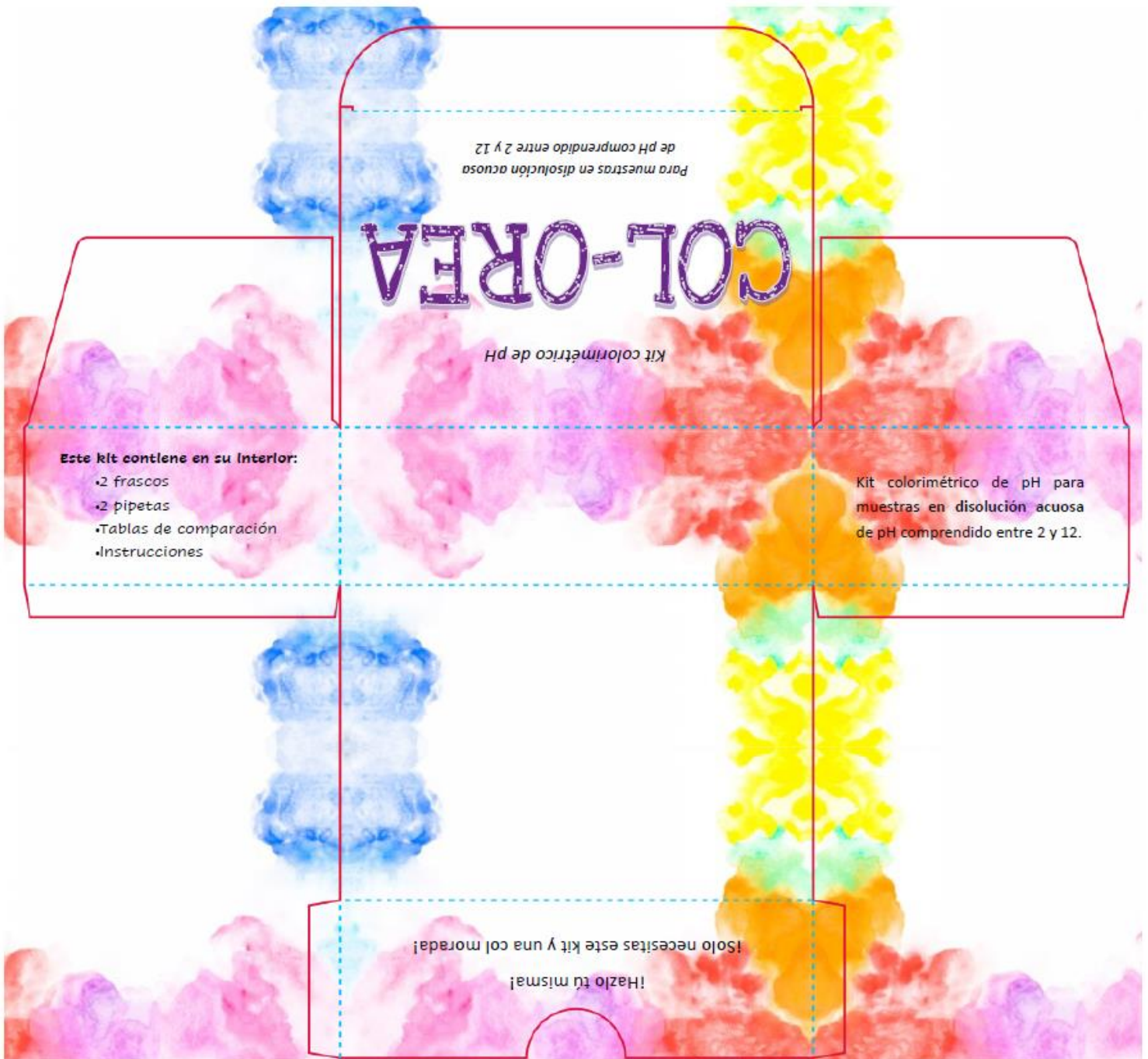


9. ANEXO 3. Prototipos y plantillas.

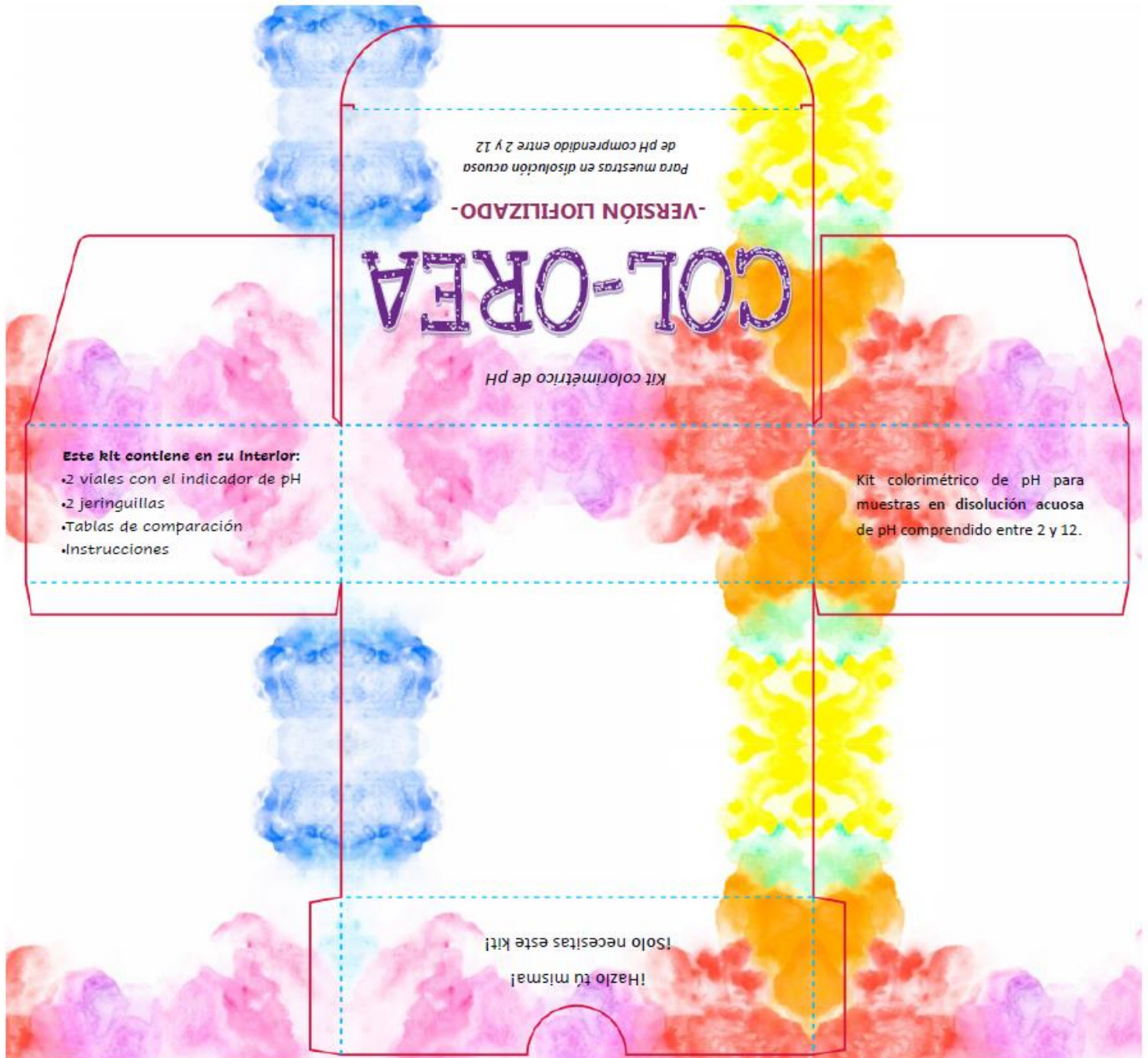
PROTOTIPOS

CAJAS

VERSIÓN 'NORMAL'



VERSIÓN 'LIOFILIZADO'



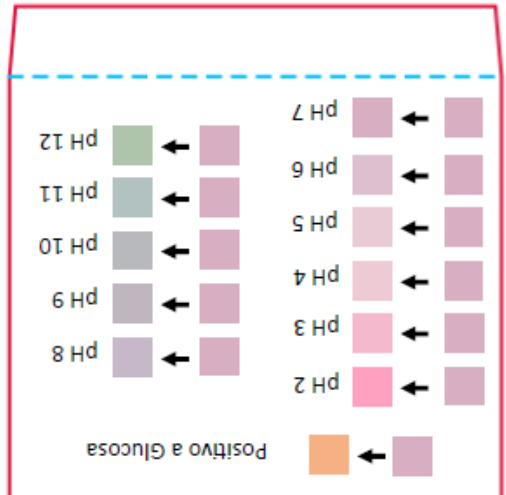
VERSIÓN 'TIRAS'

Formato 'caja de cerillas'

La carcasa



Echar una gota en cada cuadrado con reactivo y comparar el cambio de color.



Echar una gota en cada cuadrado con reactivo y comparar el cambio de color.



Tiras bi-reactivas

- Para pH entre 2 y 12
- Glucosa > 1 ppm

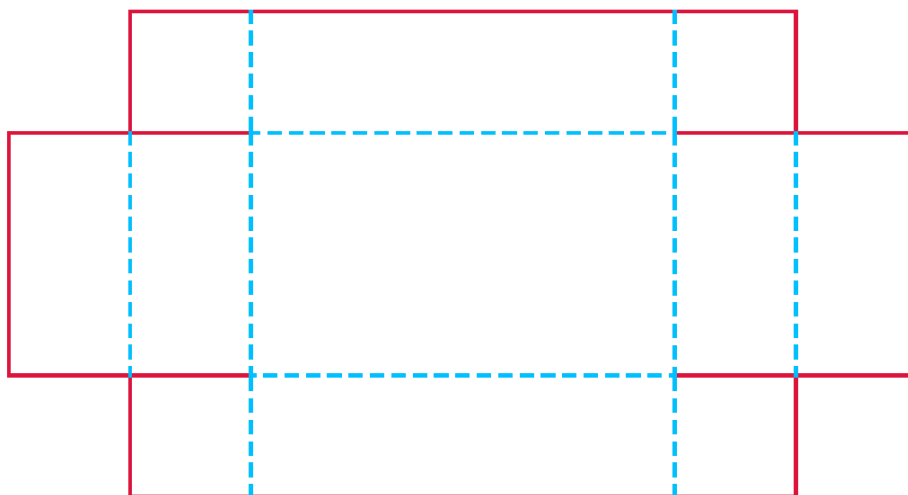


Tiras bi-reactivas

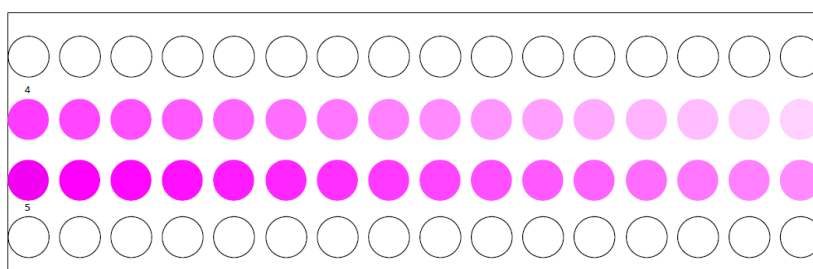
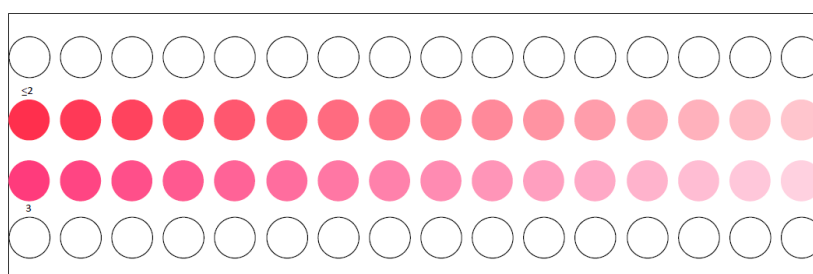
- Para pH entre 2 y 12
- Glucosa > 1 ppm

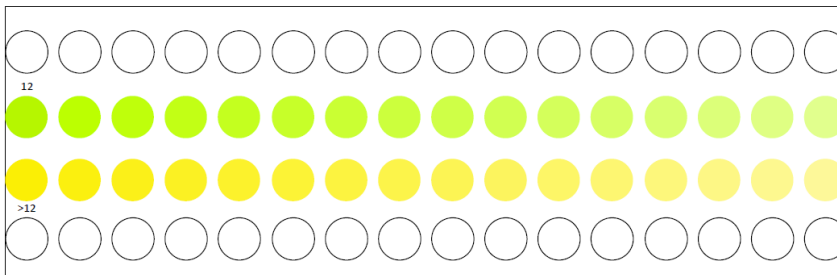
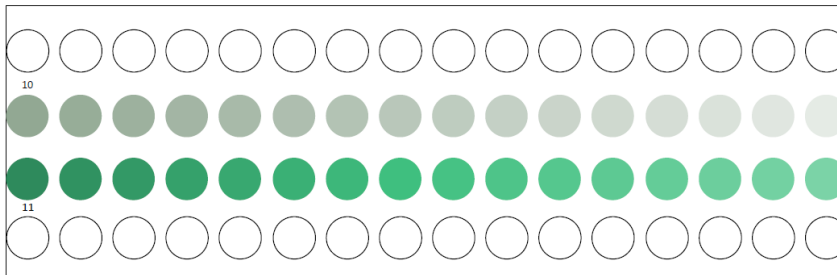
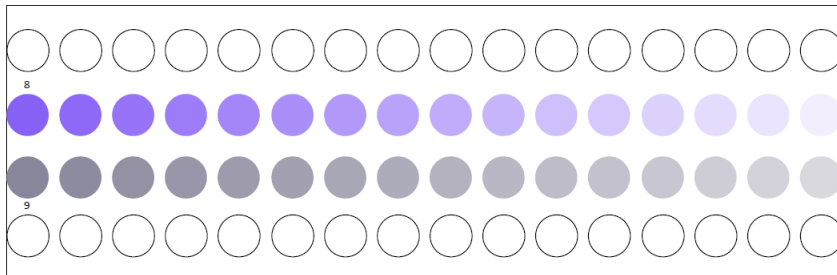
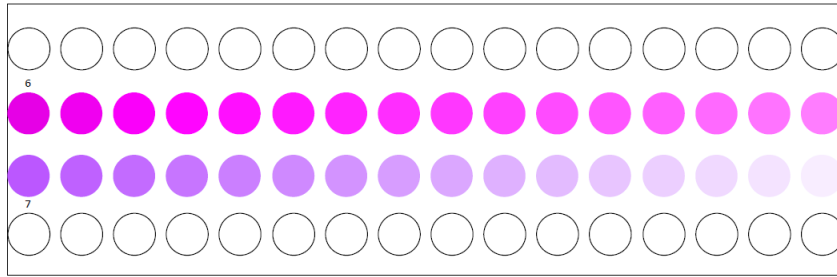
La cajetilla

Match Box : tray
7 x 4 x 2 (cm)



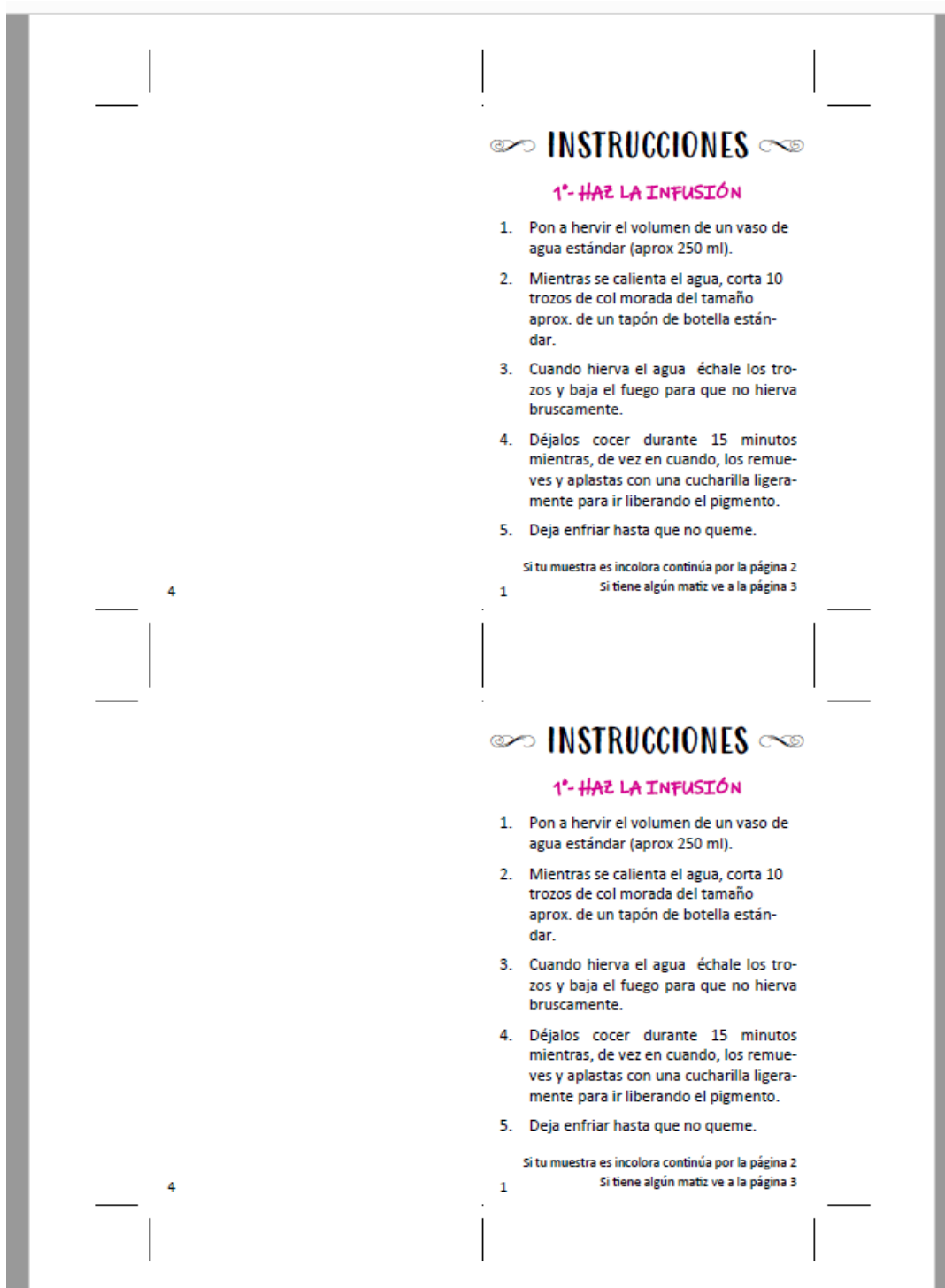
TABLAS DE COMPARACIÓN QUE VAN SEPARADAS DE LA CAJA (VERSIONES NORMAL Y LIOFILIZADO)





INSTRUCCIONES QUE VAN SEPARADAS DE LA CAJA (VERSIONES NORMAL Y LIOFILIZADO)

VERSION NORMAL FORMATO FOLLETO:



2°- SI TU MUESTRA ES INCOLORA Y TRANSPARENTE:

1. Verter tu muestra acuosa en uno de los frascos hasta la línea (2ml).
2. Con ayuda de la pipeta tomar parte de la infusión violeta que has preparado y echarle al frasco con tu muestra las gotas necesarias hasta que distingas bien el color que toma.
3. Mover un poco para mezclar y comparar el color resultante lo más rápido que puedas con la tabla de comparación y leer el pH correspondiente.

Asegúrate siempre de tener una buena iluminación

2°- SI TU MUESTRA TIENE ALGUNA TONALIDAD PERO SIGUE SIENDO TRANSPARENTE:

1. Vierte en ambos frascos la misma cantidad de muestra (hasta la línea).
2. Solo en el tubo A echa con la pipeta las gotas necesarias de la infusión y muévelo para mezclarlo.
3. Coloca el tubo B encima de la tabla y ve pasándolo por encima de los diferentes colores hasta que a su través veas el color de la disolución A. Quédate con ese color de la tabla y lee su pH.

Asegúrate siempre de tener una buena iluminación

2°- SI TU MUESTRA ES INCOLORA Y TRANSPARENTE:

1. Verter tu muestra acuosa en uno de los frascos hasta la línea (2ml).
2. Con ayuda de la pipeta tomar parte de la infusión violeta que has preparado y echarle al frasco con tu muestra las gotas necesarias hasta que distingas bien el color que toma.
3. Mover un poco para mezclar y comparar el color resultante lo más rápido que puedas con la tabla de comparación y leer el pH correspondiente.

Asegúrate siempre de tener una buena iluminación

2°- SI TU MUESTRA TIENE ALGUNA TONALIDAD PERO SIGUE SIENDO TRANSPARENTE:

1. Vierte en ambos frascos la misma cantidad de muestra (hasta la línea).
2. Solo en el tubo A echa con la pipeta las gotas necesarias de la infusión y muévelo para mezclarlo.
3. Coloca el tubo B encima de la tabla y ve pasándolo por encima de los diferentes colores hasta que a su través veas el color de la disolución A. Quédate con ese color de la tabla y lee su pH.

Asegúrate siempre de tener una buena iluminación

VERSIÓN LIOFILIZADO FORMATO TARJETA:

INSTRUCCIONES

SI TU MUESTRA ES INCOLORA Y TRANSPARENTE:

1. Toma tu muestra acuosa con todo el volumen de la jeringuilla.
2. Inyecta tu muestra en uno de los viales que tienen pigmento en su interior.
3. Mueve un poco para mezclar y compara el color resultante lo más rápido que puedas con la tabla de comparación y leer el pH correspondiente.

Asegúrate siempre de tener
una buena iluminación

INSTRUCCIONES

SI TU MUESTRA ES INCOLORA Y TRANSPARENTE:

1. Toma tu muestra acuosa con todo el volumen de la jeringuilla.
2. Inyecta tu muestra en uno de los viales que tienen pigmento en su interior.
3. Mueve un poco para mezclar y compara el color resultante lo más rápido que puedas con la tabla de comparación y leer el pH correspondiente.

Asegúrate siempre de tener
una buena iluminación

**SI TU MUESTRA TIENE ALGUNA
TONALIDAD PERO SIGUE SIENDO
TRANSPARENTE:**

1. Toma tu muestra acuosa con todo el volumen de la jeringuilla.
2. Inyecta tu muestra primero en un vial vacío (tubo B) y luego otra vez en uno de los viales que tienen pigmento en su interior (tubo A).
3. Coloca el tubo B encima de la tabla y ve pasándolo por encima de los diferentes colores hasta que a su través veas el color de la disolución A. Quédate con ese color de la tabla y lee su pH.

**Asegúrate siempre de tener
una buena iluminación**

**SI TU MUESTRA TIENE ALGUNA
TONALIDAD PERO SIGUE SIENDO
TRANSPARENTE:**

1. Toma tu muestra acuosa con todo el volumen de la jeringuilla.
2. Inyecta tu muestra primero en un vial vacío (tubo B) y luego otra vez en uno de los viales que tienen pigmento en su interior (tubo A).
3. Coloca el tubo B encima de la tabla y ve pasándolo por encima de los diferentes colores hasta que a su través veas el color de la disolución A. Quédate con ese color de la tabla y lee su pH.

**Asegúrate siempre de tener
una buena iluminación**