

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS EN UVAS MUSCADINAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Eduardo Pastrana Bonilla*
Nelson Gutiérrez Guzmán**

Resumen

Se analizó el contenido de antocianinas totales y el perfil de antocianinas individuales presentes en 10 cultivares de uvas muscadinas (5 de piel púrpura y 5 de piel bronce), cultivadas en el sur del estado de Georgia (Estados Unidos). Para efectos del análisis, las frutas fueron separadas en sus partes: piel, semilla y pulpa. El contenido de antocianinas totales fue determinado mediante un método de diferencial de pH y varió de 31 a 75 mg/100g de fruta fresca en las uvas púrpuras y de 0.4 a 1.3 en las uvas de color bronce. Las antocianinas individuales fueron analizadas mediante HPLC y su identidad confirmada mediante técnicas de HPLC-MS. La Delfinidina-3,5-diglucósido fue la antocianina más abundante (cerca del 46% del contenido total de antocianinas) y fue encontrada en las pieles de todas las frutas, en las semillas de 9 de los cultivares, y en las pulpas de 3. Petunidina-3,5-diglucósido (~23%) y malvidina-3,5-diglucósido (~20%) fueron las siguientes en concentración, pero solo fueron encontradas en las pieles de 8 y las semillas de 5 de los cultivares estudiados. Cianidina-3,5-diglucósido (~6%), peonidina-3,5-diglucósido (~3%) y petunidina-3-monoglucósido (~1%) fueron también detectadas en las pieles de las frutas de piel púrpura. En este artículo se reporta por primera vez la presencia de petunidina-3-monoglucósido en uvas muscadinas. El contenido de antocianinas y la suma de antocianinas individuales presentaron una correlación alta ($R = 0.98$). El promedio del contenido de antocianinas totales reportado en este artículo fue mas bajo que los publicados para uvas de tipo europeo y otras uvas americanas de piel roja y de otras frutas comunes. Sin embargo, las uvas muscadinas de piel púrpura presentaron niveles de antocianinas que pueden ser consideradas de importancia nutracéutica.

Palabras clave: *Antocianinas, Uvas Muscadinas, Cromatografía líquida de alta resolución, Espectrometría de Masas.*

IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF ANTHOCYANINS IN MUSCADINE GRAPES THROUGH LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY

Abstract

Total anthocyanin content and individual anthocyanin profile of ten cultivars (5 purple skin and 5 bronze skin) of muscadine grapes, grown in South Georgia, were assessed. Fruits were separated into skins, seeds and pulps for analysis. Total anthocyanin content was determined by a pH differential method and it varied from 31 to 75 mg/100g FW in the purple grapes and from 0.4 to 1.3 in the bronze grapes. Individual anthocyanins were analyzed by HPLC and their identity confirmed by HPLC-MS. Delphinidin-3,5-diglucoside was the most abundant (about 46% of the total anthocyanin content) and was found in the skins of all fruits, the seeds of 9 cultivars, and the pulps of 3. Petunidin-3,5-diglucoside (~23%) and malvidin-3,5-diglucoside (~20%) were the next in concentration but only found in the skins of 8 and in 5 seeds of the cultivars, respectively. Cyanidin-3,5-diglucoside (~6%), peonidin-3,5-diglucoside (~3%) and petunidin-3-monoglucoside (~1%) were also found in the skins of the purple grapes. This is the first report of petunidin-3-monoglucoside in muscadine grapes. The total anthocyanin content and the sum of the individual anthocyanins had a high correlation ($R = 0.98$). The average anthocyanin content of muscadine grapes was lower than published values for red European or other American red grapes, and other common berries. However, the purple muscadine grapes have anthocyanins levels that may be considered important from the nutraceutical point of view.

Key words: *anthocyanins, Muscadine grapes, High Performance Liquid Chromatography, Mass Spectrometry.*

Artículo recibido: 12/11/08 Aprobado: 15/04/09

* Profesor Titular Facultad de Ingeniería, Universidad Surcolombiana. Email: pastrana@usco.edu.co

** Profesor Asistente Facultad de Ingeniería, Universidad Surcolombiana Email: ngutierrezg@usco.edu.co

1. Introducción

La uva muscadina (*Vitis rotundifolia Michx.*) es nativa del sureste de los Estados Unidos. Las muscadinas son vides vigorosas que pueden crecer hasta 30 metros en estado silvestre. Ellas difieren botánicamente de otras uvas y se clasifican en un género subalterno separado, Muscadinia. Las frutas de la vid de muscadina pueden tener hasta 3 centímetros de diámetro, son redondas, tienen la piel gruesa y dura y pueden tener hasta 5 semillas.

Las antocianinas son solubles en agua, son derivados glicosilados (Goiffon and Brun 1991) (Chandra, Rana and Li 2001) del aglicon de cianidina y hacen parte de la familia de los flavonoides. Estos pigmentos son responsables de los colores rojo, púrpura y azul de la mayoría de las frutas y flores (Da Costa, et al. 1998). Las antocianinas tienen el potencial de ser usadas como colorantes naturales en alimentos. Sin embargo, enzimas, pH, temperatura y oxígeno afectan su color, lo que se presenta como una limitación para su uso (Chandra, Rana and Li 2001), aunque la co-pigmentación con otros compuestos fenólicos puede aumentar su estabilidad (Darias-Martin, et al. 2001). Las antocianinas hacen parte de la dieta humana ya que están presentes en muchas frutas y verduras (Sellappan, Akoh and Krewer 2002). El consumo medio diario de antocianinas en los Estados Unidos se estima en 215 mg durante el verano y 180 mg durante el invierno (Clifford 2000). Su actividad antioxidante es beneficiosa y, por consiguiente, el efecto positivo sobre la salud es un valor agregado significativo. Su función antioxidante parece estar relacionada con su capacidad de donación de hidrógeno, quelación de metales y capacidad de unirse a proteínas (Satue-Gracia, Heinonen and Frankel 1997). Se ha encontrado que las antocianinas son antioxidantes poderosos comparadas con otros antioxidantes comunes como el hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) y el tocoferol (Narayan, et al. 1999) (Espin, et al. 2000). Se han usado extractos de fruta ricos en antocianinas en la medicina tradicional como agentes antiinflamatorios (Wang, et al. 1999), para el tratamiento y prevención de enfermedades vasculares inducidas por colesterol como la arteriosclerosis, y como agentes anti-cancerígenos (Lauro and Francis 2000). También se ha reportado que las antocianinas tienen actividad antiulcerativa y proporcionan protección contra la radiación UV (Mazza and Miniati 1993). Los posibles mecanismos para la actividad antiinflamatoria de las antocianinas incluyen la inhibición

del metabolismo del ácido araquidónico y de la actividad de prostaglandin-sintasa-ciclooxigenasa (Aruoma and Cuppett 1997).

Las antocianinas presentes en el vino rojo pueden tener efectos antiaterogénicos junto con otros polifenoles encontrados en el vino (Frankel and Kinsella 1993). Kamei et al. (1995) estudiaron el efecto anticancerígeno in-vitro de las antocianinas sobre células tumorales. Se ha encontrado que cianidina y delfinidina son las antocianinas más abundantes en las plantas (Meiers, et al. 2001). La cianidina bajó la concentración en el suero de la sustancia ácido-reactiva tiobarbitúrica (TBARS) y aumentó la resistencia a la oxidación del suero y a la peroxidación de lípidos en las ratas (Tsuda, et al. 2002). Se ha reportado que la delfinidina inhibe el crecimiento de tumores en líneas celulares interceptando su factor de crecimiento (Tsuda, et al. 2002). Mazza y Miniati (1993) y Talcott y Lee (2002) informaron que las antocianinas presentes en las uvas muscadina se encuentran básicamente en la forma de diglucósidos. El objetivo de esta investigación es identificar y cuantificar las antocianinas presentes en 10 cultivares de uvas muscadina cultivadas en el sur del Estado de Georgia, Estados Unidos.

2. Materiales y métodos

Químicos. Compuestos estándar (con más de 97% pureza) de malvidin-3-O-β-glucopiranosido (mv-3-gl), delfinidina-3-O-β-glucopiranosido (dp-3-glc), petunidina-3-O-β-glucopiranosido (pt-3-glc), peonidina-3-O-β-glucopiranosido (pn-3-glc), y cianidina-3-O-β-glucopiranosido (cy-3-glc) fueron adquiridos en Polyphenols Laboratorios (Sandnes, Noruega). Cloruro de potasio y acetato de sodio fueron comprados a de J.T. Baker Chemical Company (Phillipsburg, NJ). Acetonitrilo, metanol, ácido O-fosfórico (85% pureza, grado HPLC), ácido fórmico y agua (grado HPLC) se compraron a Fisher Scientific (Norcross, GA).

Preparación de estándares. Las soluciones normales de base (100 µg/mL) de las antocianinas mv-3-gl, dp-3-glc, pt-3-glc, pn-3-glc, y cy-3-glc se prepararon en 2% HCl en metanol y se guardaron durante una semana a -86°C. Cada semana se prepararon nuevas soluciones normales para asegurar la frescura de las mismas. Las soluciones de trabajo de 100, 75, 50, y 25 µg/mL se prepararon para construir curvas de calibración para cada compuesto usando el software TableCurve 2D V5.0 (SPSS Inc.,

Chicago, IL). Aleatoriamente y a diario se seleccionaron soluciones de trabajo para verificar la validez del método y la posible degradación de las soluciones normales. No se detectó ninguna degradación de las soluciones normales durante el periodo de tiempo que permanecieron almacenadas.

Muestras. El estudio se hizo para frutas seleccionadas de diez cultivares de uva muscadina, cinco de piel bronce (Carlos, Early Fry, Fry, Summit y Late Fry), y cinco de piel púrpura (Paulk, Cowart, Supreme, Ison y Noble), cultivadas en el sur del estado de Georgia (Paulk vineyards, Wray, GA). Las frutas fueron separadas en sus partes: piel, semilla y pulpa. Todas las muestras se prepararon por triplicado para el análisis.

Antocianinas individuales. Un gramo de cada muestra fue majado usando un mortero hasta obtener una pasta fina la cual fue diluida en 2% HCl en metanol. Las muestras fueron homogenizadas durante 1 minuto y luego se colocaron en un baño maría con agitador a 25 °C y 200 rpm durante 24 h. Finalmente, las muestras fueron de nuevo homogenizadas durante 1 minuto para maximizar la extracción. Las muestras extraídas se filtraron a través de un filtro de polipropileno de 0.45- μ m y del filtrado una alícuota de 20 μ L fue inyectada en un sistema de HPLC con detector de banco de diodos Hewlett-Packard HP 1100 (Avondale, PA). La fase móvil fue: el solvente A: ácido O-fosfórico/metanol/agua (5:10:85, v/v/v), y solvente B: acetonitrilo. El gradiente determinado para la separación antocianinas fue: a 0 min 100% solvente A, a 5 min 90% solvente A y 10% solvente B, y a 25 min 50% solvente A y 50% solvente B, con 5 min de post-análisis con agua grado-HPLC. Velocidad de flujo de solvente: 0.5 mL/min. Columna: Beckman Ultrasphere C18 ODS 4.6 x 250 mm. Temperatura: 40°C.

Se identificaron Antocianina-3,5-diglucósidos y fueron cuantificados por las características cromatográficas de sus antocianina-3-monoglucósidos correspondientes, y su identidad se verificó mediante análisis de espectrometría de masas, el cual se realizó bajo las mismas condiciones cromatográficas descritas para el análisis de HPLC (sólo que el ácido O-fosfórico se reemplazó por ácido fórmico), usando un sistema LC-MS con un instrumento de HPLC de Thermo Separations Products HPLC (San José, California) acoplado a un espectrómetro de masas API con detector de cuadrupolo Perkin Elmer Sciex (Shelton, Connecticut).

Antocianinas totales. Cada parte de la uva (la piel, semilla o pulpa) fue extraída en 2% HCl en metanol, durante 24 h a temperatura ambiente y en la oscuridad, luego fue diluida hasta una concentración apropiada con un buffer de cloruro de potasio, pH 1, hasta que la absorbancia de la muestra estuviera dentro del rango lineal de un espectrofotómetro de UV-Vis Shimadzu 300 (Rydalmere, Australia). El espectrofotómetro se calibró a cero con agua destilada. Se prepararon dos diluciones de cada muestra, una con buffer de cloruro de potasio, pH 1, y la otra con buffer de acetato de sodio, pH 4.5. Las diluciones se dejaron equilibrar durante 15 min. La absorbancia fue medida a 520 y a 700 nm (para corrección de turbidez) contra una celda de blanco llena de agua destilada, siguiendo el método de diferencial de pH descrito por Giusti y Wrolstad (MarcadorDePosición1)(19).

Análisis estadístico. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el paquete de software Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Mountain View, CA). Cada análisis se hizo para tres repeticiones y se determinó la desviación estándar. Se realizaron la regresión y área bajo la curva en cada análisis usando el software TableCurve 2D V5.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

3. Resultados y discusión

Las antocianinas fueron identificadas por sus tiempos de retención y los espectros característicos. La cuantificación se hizo mediante curvas de la calibración de normas externas construidas para cada uno de los compuestos normales (mv-3-glc, dp-3-glc, pt-3-glc, pn-3-glc, y cy-3-glc), y sus antocianidinas correspondientes, después de la hidrólisis ácida. Se encontró, basado en el análisis de HPLC-MS y de acuerdo con los resultados de Talcott y Lee (2002), que los antocianin-3,5-diglucósidos pusieron se correlacionan bien con su antocinidina correspondiente. La tabla 1 muestra que el delphinidin-3,5-diglucósido (dp-3,5-di-glc) es la antocianina más abundante encontrada en las pieles de la uva muscadina con concentraciones que van desde 1.1 hasta 2.8 mg/100 g de peso fresco (PF) en el caso de las uvas muscadina de piel bronce, y desde 23.0 hasta 95.3 mg/100g PF para las de pieles purpúreas. La segunda antocianina mas abundante en las pieles es la petunidina-3,5-diglucósido (pt-3,5-di-glc), presente en todas las pieles purpúreas, y varía de 19.5 a 52.6 mg/100g PF, y se encontró en tres de las cinco pieles de bronce variando de 0.9 a 1.3 mg/100g PF. Malvidin-3,5-diglucósido (mv-3,5-di-glc),

Tabla 1. Antocianinas en las Pielas de la Uva Muscadina (mg/100 g PF)¹

| Cultivar | Dp-3,5-di-glc | pt-3,5-di-glc | mv-3,5-di-glc | cy-3,5-di-glc | pn-3,5-di-glc | pt-3-glc |
|-----------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------|
| Carlos | 1.3 ± 0.1 | 1.3 ± 0.1 | nd | nd | nd | nd |
| Early fry | 1.4 ± 0.1 | 1.2 ± 0.1 | nd | nd | nd | nd |
| Fry | 1.1 ± 0.1 | nd | nd | nd | nd | nd |
| Summit | 2.8 ± 0.1 | nd | nd | nd | nd | nd |
| Late fry | 1.2 ± 0.1 | 0.9 ± 0.1 | nd | nd | nd | nd |
| Paulk | 95.3 ± 4.9 | 29.8 ± 1.9 | 45.8 ± 2.8 | 13.8 ± 0.2 | 6.3 ± 0.1 | 2.3 ± 0.1 |
| Cowart | 54.9 ± 4.0 | 28.8 ± 1.9 | 15.8 ± 0.7 | 6.0 ± 0.8 | 3.7 ± 0.2 | 1.4 ± 0.1 |
| Supreme | 74.9 ± 3.5 | 33.5 ± 2.1 | 20.3 ± 1.1 | 11.5 ± 0.9 | 3.9 ± 0.1 | 1.5 ± 0.1 |
| Ison | 85.1 ± 4.0 | 52.6 ± 2.9 | 31.5 ± 1.2 | 9.3 ± 0.9 | 7.3 ± 0.2 | 2.3 ± 0.2 |
| Noble | 23.0 ± 2.0 | 19.5 ± 1.0 | 31.9 ± 1.5 | 5.9 ± 0.5 | 3.8 ± 0.1 | 1.3 ± 0.1 |

¹ Los valores son promedios y desviaciones estándar de triplicados; nd = no detectado.

cyanidin-3,5-diglucósido (si-3,5-di-glc), y peonidin-3,5-diglucósido (pn-3,5-di-glc) no se detectaron en las pieles de las frutas de color bronce, pero fueron detectadas en las muscadinas púrpuras variando de 15.8 a 45.8 mg/100g PF, de 5.9 a 13.8 mg/100g PF, y de 3.8 a 7.3 mg/100g PF, respectivamente. Además, petunidin-3-glucósido fue el único monoglucósido detectado en las pieles de las uvas purpúreas con concentraciones de 1.3 a 2.3 mg/

100 g PF. La presencia de petunidin-3-monoglucósido no se ha reportado previamente para las uvas Muscadina.

Delphinidin-3,5-diglucósido fue la única antocianina detectada en las semillas y en las pulpas (Tabla 2). Ella se encontró en las semillas de cuatro de las cinco frutas de color bronce variando entre 3.1 y 5.8 mg/100g PF, y también se detectó en las semillas de los 5 cultivares de

Tabla 2. Delfinidina-3,5-diglucósido en Semillas y Pulpas (mg/100 g PF)¹

| Cultivar | Semillas | Pulpas |
|-----------|-----------|-----------|
| Carlos | nd | nd |
| Early fry | 5.8 ± 0.5 | nd |
| Fry | 4.2 ± 0.7 | nd |
| Summit | 3.1 ± 0.3 | nd |
| Late fry | 3.3 ± 0.2 | nd |
| Paulk | 4.1 ± 0.3 | 4.2 ± 0.1 |
| Cowart | 4.3 ± 0.2 | nd |
| Supreme | 6.4 ± 0.4 | nd |
| Ison | 4.0 ± 0.2 | 1.7 ± 0.1 |
| Noble | 2.5 ± 0.1 | 2.2 ± 0.1 |

¹ Los valores son promedios y desviaciones estándar de triplicados; nd = no detectado.

frutas purpúreas con una concentración que varió de 2.4 a 6.4 mg/100g PF. Delphinidin-3,5-diglucósido no se detectó en las pulpas de las frutas de bronce, pero se encontró en 3 de las 5 pulpas de frutas purpúreas con concentraciones que van de 1.7 a 4.2 mg/100g PF.

La tabla 3 muestra el contenido de antocianinas individuales calculado para las uvas Muscadina. El cálculo

fue basado en el contenido de la antocianina encontrado en cada parte de fruta multiplicado por la fracción de peso de la parte de fruta con respecto al peso total de la fruta (datos no mostrados). El perfil de antocianinas en las uvas enteras siguió la misma tendencia del de las pieles debido a que estas son un componente mayor de la fruta (41% de la fruta entera, en promedio). Las pieles representan el principal contenido de antocianinas en la fruta.

Tabla 3. Antocianinas en las Uvas de Muscadine (mg/100 g PF)¹

| Cultivar | dp-3,5-di-glc | pt-3,5-di-glc | mv-3,5-di-glc | cy-3,5-di-glc | pn-3,5-di-glc | pt-3-glc | Total |
|-----------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------|-------|
| Carlos | 0.4 | 0.4 | nd | nd | nd | nd | 0.8 |
| Early fry | 0.6 | 0.4 | nd | nd | nd | nd | 1.0 |
| Fry | 0.6 | nd | nd | nd | nd | nd | 0.6 |
| Summit | 1.3 | nd | nd | nd | nd | nd | 1.3 |
| Late fry | 0.7 | 0.4 | nd | nd | nd | nd | 1.1 |
| Paulk | 41.3 | 12.1 | 18.2 | 5.6 | 2.6 | 2.3 | 82.1 |
| Cowart | 19.0 | 9.8 | 5.4 | 2.0 | 1.3 | 1.4 | 38.9 |
| Supreme | 35.9 | 16.0 | 9.7 | 5.5 | 1.8 | 1.5 | 70.4 |
| Ison | 34.4 | 20.6 | 12.3 | 3.7 | 2.8 | 2.3 | 76.1 |
| Noble | 11.8 | 9.0 | 14.8 | 2.7 | 1.7 | 1.3 | 41.3 |

¹ Los valores fueron calculados con base en la proporción de peso de cada parte de la fruta con respecto al peso total de la misma; nd = no detectado.

El contenido de antocianinas totales en las partes de la uva Muscadina (Tabla 4) varió de 0.4 a 1.3 mg/100g PF para las uvas del piel bronce y de 31.1 a 74.5 mg/100g PF en el caso de las uvas púrpura. En promedio, se encontró 92.4% del volumen de antocianinas totales en la piel de las uvas, 6.1% en las semillas y 1.5% en las pulpas. El bajo porcentaje de antocianinas en las pulpas puede deberse a alguna transferencia de antocianinas de la piel en el momento del corte, ya que las pulpas carecían de la coloración característica de las antocianinas. El contenido de antocianinas en las uvas Muscadina resultó ser más bajo comparado con otras uvas o bayas; sin embargo, esta comparación no es confiable debido a los diferentes métodos que cada autor reportó para los procesos de

extracción y análisis. La tabla 5 muestra algunos valores de contenido de antocianinas para otras frutas encontrados en la literatura.

Los resultados aquí reportados están de acuerdo con los publicados por Mazza y Miniati (1993) y Goldy et al. (1989) quienes reportaron el mismo orden en la concentración de antocianin-diglucósidos en las uvas Muscadina e indicaron que la principal antocianina fue la delphinidin-3,5-diglucósido. No hay, sin embargo, concordancia en las proporciones de las antocianinas individuales, lo cual no es sorprendente ya que los factores agro-ecológicos y varietales pueden afectar las características morfológicas y la composición química de los productos agrícolas. Además

Tabla 4. Antocianinas Totales en las Partes y en la Fruta Entera de la Uva Muscadine (mg/100 g PF como cianidina-3-glucósido)¹

| Cultivar | piel | semilla | pulpa | fruta entera |
|-----------|-------|---------|-------|--------------|
| Carlos | 2.5 | 1.3 | nd | 0.9 |
| Early Fry | 2.5 | 8.5 | nd | 1.1 |
| Fry | 0.7 | 4.1 | nd | 0.4 |
| Summit | 2.9 | 3.5 | nd | 1.3 |
| Late Fry | 2.0 | 4.0 | nd | 1.1 |
| Paulk | 174.5 | 4.0 | 4.2 | 74.5 |
| Cowart | 101.5 | 4.4 | 0.9 | 37.5 |
| Supreme | 143.2 | 7.8 | 0.8 | 65.6 |
| Ison | 170.2 | 4.1 | 1.7 | 69.4 |
| Noble | 67.8 | 2.1 | 2.1 | 31.1 |

¹ Los valores son promedios de triplicados; nd = no detectado.

Tabla 5. Contenido de Antocianinas Totales de Algunas Frutas (mg/100g PF).

| Fruta | Contenido de Antocianinas | Referencia |
|---|---------------------------|---------------------------|
| Moras (<i>Rubus</i> spp.) | 83 - 326 | (23) |
| Moras (<i>Rubus</i> spp.) Cultivadas en Georgia | 111 - 123 | (5) |
| Morazul (<i>Vaccinium</i> spp.) | 25 - 495 | (12) |
| Morazul (<i>Vaccinium</i> spp.) Cultivado en Georgia | 16 - 197 | (5) |
| Arándanos (<i>Vaccinium macrocarpon</i> Ait.) | 78 | (12) |
| Frambuesas negras (<i>Ribes nigrum</i> L.) | 250 | (12) |
| Moras negras (<i>Rubus occidentalis</i> L.) | 214 - 428 | (23) |
| Uvas rojas (<i>Vitis vinifera</i>) | 30 - 750 | (12) |
| Uvas Muscadina Purpura (<i>Vitis rotundifolia</i> Michx) | 31-75 | <i>Esta investigación</i> |

de los 5 diglucósidos reportados por Mazza y Miniati, se pudo adicionalmente identificar un monoglucósido (petunidin-3-glucoside). La figura 1 muestra los cromatogramas de HPLC para A: los estándares de los monoglucósidos, y B: muestras de pieles de uva Muscadina. Como se indicó anteriormente, la cuantificación de diglucósidos de antocianinas se hizo con base en las curvas de calibración construidas para los estándares de monoglucósidos y sus antocianidinas correspondientes, siguiendo el método descrito por Talcott y Lee (2002).

La Figura 2 exhibe los espectros de masas para una muestra de piel de uva y los diferentes iones moleculares presentes de las antocianinas. Los perfiles de antocianinas de las uvas Muscadina difieren grandemente de los de las uvas europeas (*Vitis vinifera*). El perfil de antocianinas es más complejo en el caso de las *Vitis vinifera* ya que tienen más de 20 antocianinas

diferentes, entre las cuales la más abundante es malvidin-3-glucósido (Goiffon, Mouly and Gaydou 1999). Todas las antocianinas en las *Vitis vinifera* son monoglucósidos, algunos están aciladas, y no hay diglucósidos presentes (Mazza and Miniati 1993) (Mazza, et al. 1999). En contraste, las uvas Muscadina (*Vitis rotundifolia*) presentan antocianinas en forma de diglucósidos, principalmente; ninguna de las antocianinas es el asilada y malvidin es un pigmento menor en este tipo de uvas. Las diferencias en el perfil de antocianinas pueden tener origen en los caminos evolutivos diferentes tomados por las dos especies. Además, las uvas europeas tienen una historia larga de cambios inducidos que apuntan a la mejora de la calidad del vino y a la búsqueda de nuevos sabores, colores y aromas. Por el contrario, las uvas Muscadina han permanecido básicamente en su estado natural, solo sujetas a la selección natural.

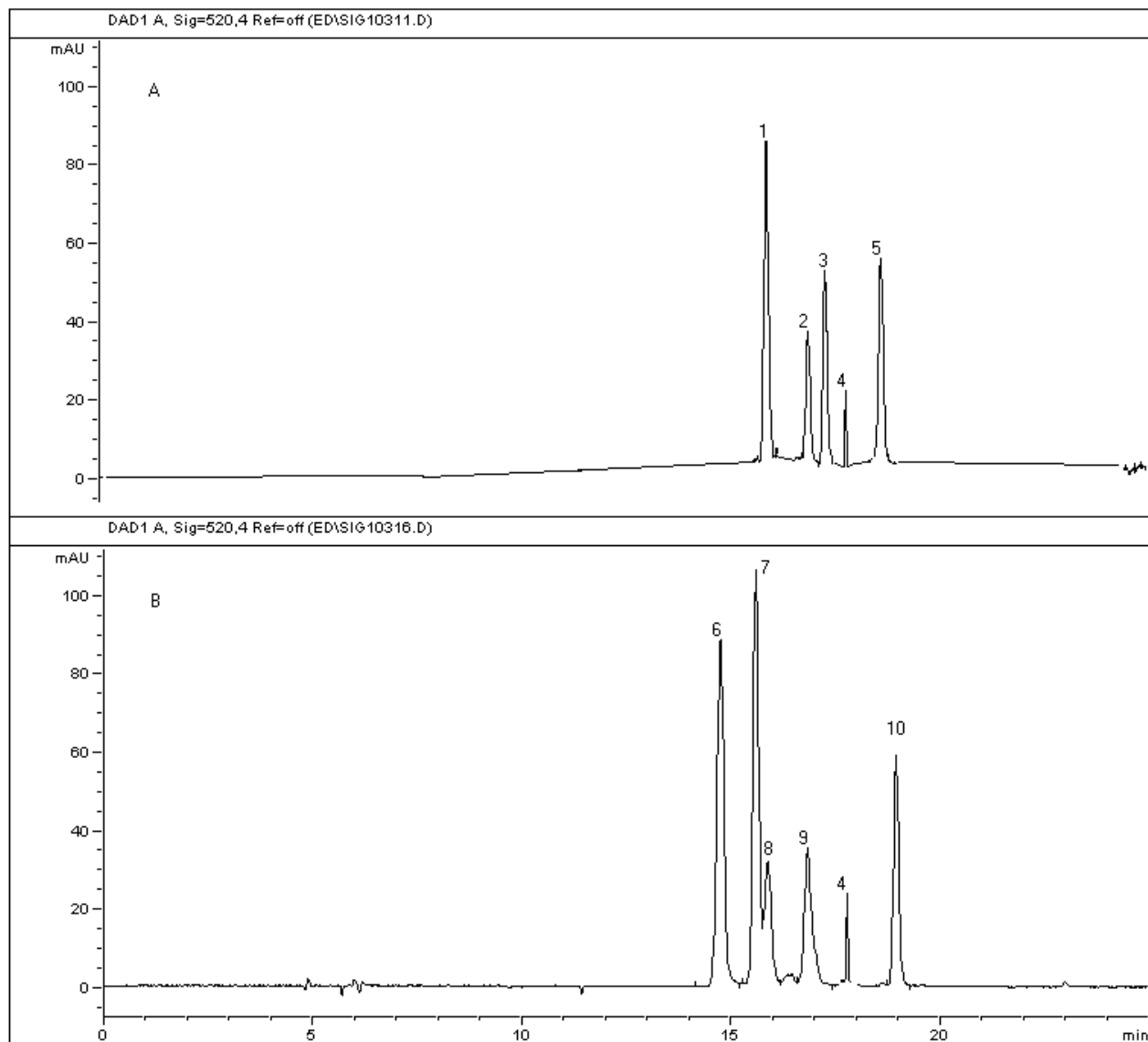


Figura 1. (A) Cromatograma de HPLC a 520 nm de estándares de monoglucósidos de las antocianinas: delphinidina-3-glucósido (1), cianidina-3-glucósido (2), petunidina-3-glucósido (3), peonidina-3-glucósido (4), malvidina-3-glucósido (5). (B) cromatograma de HPLC a 520 nm de las antocianinas encontradas en la piel de las uvas del cultivar Paulk: delphinidina-3,5-diglucósido (6), cianidina-3,5-diglucósido (7), petunidina-3,5-diglucósido (8), malvidina-3,5-diglucósido (9), peonidina-3,5-diglucósido (10).

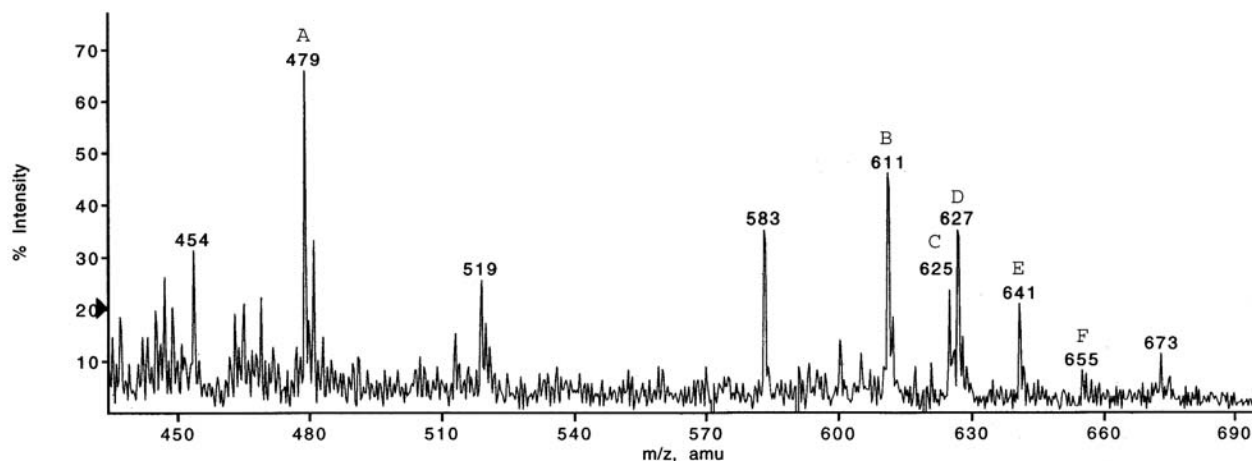


Figura 2. Espectro de masas integrado de los iones moleculares en una muestra del cultivar Paulk. Petunidina-3-glucósido (A), cianidina-3,5-diglucósido (B), peonidina-3,5-diglucósido (C), delphinidina-3,5-diglucósido (D), petunidina-3,5-diglucósido (E), y malvidina-3,5-diglucósido (F). Los otros picos no fueron identificados.

Referentes Bibliográficos

Aruoma, O. I., and S. L. Cuppett. 1997. *Antioxidant methodology: in vivo and in vitro concepts*. Champaign Illinois: AOCS Press.

Chandra, J. P., J. Rana, and Y. Q. Li. 2001. Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3515-21.

Clifford, M.N. 2000. Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80: 1063-72.

Da Costa, C. T., B. C. Nelson, S. A. Margolis, and D. Horton. 1998. Separation of blackcurrant anthocyanins by capillary zone electrophoresis. *J.Chromatogr.* 799: 321-27.

Darias-Martin, J., M. Carrillo, E. Díaz, and R. B. Boulton. 2001. Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. *Food Chem.* 73: 217-220.

Espin, J. C., C. Soler-Rivas, H. J. Wichers, and C. Garcia-Viguera. 2000. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. *J.Agric.Food Chem.* 48: 1588-92.

Frankel, E. N. K., J., and J. E. Kinsella. 1993. Inhibition in vitro of oxidation of human low density lipoproteins by phenolic substances in wine. *Lancet*: 454-457.

Giusti, M. M.; Wrolstad, R. E. 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F1.2.1-F1.2.13. New York: John Wiley & Sons.

Goiffon, J. P., Brun M., and Bourrier M. J. 1991. High-performance liquid-chromatography of red fruit anthocyanins. *J. Chromatogr.* 537: 101-121.

Goiffon, J. P., P. P. Mouly, and E. M. Gaydou. 1999. Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography. *Anal.Chim Acta.* 382: 39-50.

Goldy, R. G., E. P. Maness, H. D. Stiles, J. R. Clark, and M.A. Wilson. 1989. Pigment quantity and quality characteristics of some native *Vitis rotundifolia* Michx. *Am.J.Enol.Vitic.* 40: 253-58.

Kamei, H, et al. 1995. Suppression of tumor-cell growth by anthocyanins in-vitro. *Cancer Invest.* 13: 590-94.

Lauro, G.J., and F.J. Francis. 2000. *Natural food colorants: science and technology*. New York: Marcel Dekker.

Mazza, G, and E. Miniati. 1993. *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*. Boca Raton: CRC Press.

Mazza, G., L. Fukumoto, P. Delaquis, B. Girard, and B. Ewert. 1999. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *J.Agric. Food Chem.* 47: 4009-17.

Meiers, S., M. Kemeny, U. Weyand, R. Gastpar, E. Von Angerer, and D. Marko. 2001. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *J.Agric. Food Chem.* 49: 958-62.

Narayan, M. S., K. A. Naidu, G. A. Ravishankar, L. Srinivas, and L. V. Venkataraman. 1999. Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. In *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 50: 1-4.

Satue-Gracia, M. T., M. Heinonen, and E. N. Frankel. 1997. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3362-67.

Sellappan, S., C. C. Akoh, and G. Krewer. 2002. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. *J.Agric. Food Chem.* 50: 2432-38.

Talcott, S. T., and J. H. Lee. 2002. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice. *J.Agric. Food Chem.* 50: 3186-92.

Torre, L. C. B., B. H. 1977. Quantitative evaluation of Rubus fruit anthocyanin pigments. *J. Food Sci.* 42: 488.

Tsuda, T, F. Horio, J. Kitoh, and T. Osawa. 2002. Protective effects of dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside on liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 368: 361-66.

Wang, H., et al. 1999. Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *J. Nat. Prod.* 62: 294-96.