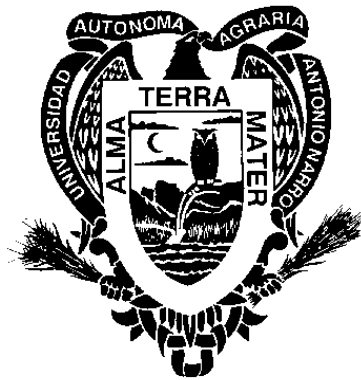


**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

**DIVISION DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y ALIMENTOS**



**EXTRACCIÓN, CUANTIFICACION Y ESTABILIDAD DE
ANTOCIANINAS EN FUENTES VEGETALES PARA SU POTENCIAL
APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.**

T E S I S

Para obtener el titulo de:

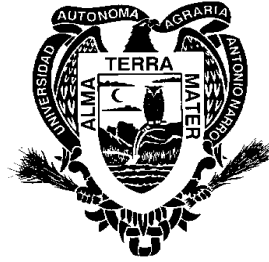
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Presenta:

RAMIRO GARCIA VILLA.

SALTILLO, COAH.

OCTUBRE 2004.



La Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” a través del jurado examinador
Hace constar que la tesis titulada:

EXTRACCIÓN, CUANTIFICACION Y ESTABILIDAD DE ANTOCIANINAS EN
FUENTES VEGETALES PARA SU POTENCIAL APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA
ALIMENTARIA.

Presentada por:

RAMIRO GARCIA VILLA

Ha sido aceptada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

En virtud de haber cumplido íntegramente los requisitos de la Comisión de Tesis y
Monografías:

A T E N T A M E N T E
“ALMA TERRA MATER”

M.C. Antonio F. Aguilera Carbo
Presidente.

Dr. Cristóbal Noe Aguilar González
1er. Vocal

Lic. Laura Olivia Fuentes Lara.
2da. Vocal

Dr. Raúl Rodríguez Herrera
Suplente

Dr. Ramón F. García Castillo
Coordinador de la División de Ciencia Animal
AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a mi **ALMA MATER** por haberme forjado como persona, individuo y ser humano integral.

Agradezco al **D.I.A** de la UA de C, por su apoyo para la elaboración de esta tesis y en especial al **Dr. Raul Rodríguez Herrera**, por haberme aceptado como parte de sus filas, realizar y colaborar junto con ellos este proyecto.

Agradezco al **M.C. Antonio Aguilera Carbó**; “Tony” por todas sus enseñanzas, paciencia y confianza, pero, sobre todo por su mas sincera amistad y creer en mi; por sus horas dadas a este trabajo, por sus regaños y consejos; gracias profe.

Agradezco al **Dr. Cristóbal Noe Aguilar González**; “Cris” por haberme apoyado en este proyecto, por escucharme, darme consejos valiosos que recordare siempre y su tiempo; también muchas gracias cris.

Agradezco a la **Lic. Laura Olivia Fuentes Lara**, por el apoyo para la realización de esta tesis.

Agradezco al **T.L.Q. Carlos Sanmiguel Arévalo**, por haberme ayudado en la realización de esta tesis.

Agradezco a mis maestros **Xochitl Rúelas, Oscar Reboloso** y en especial a la **M.C. Maria Hernández González** por sus enseñanzas.

Agradezco a **Rene Varela Alderete**; por su amistad, risas, llantos y todos los momentos compartidos a lo largo de todo este tiempo, por ser mi amigo y dejarme ser su amigo; gracias entena de todo corazón.

Agradezco a **Gladys “Virginia” Chávez Galindo**; por su amistad, apoyo, confianza, consejos, risas, tonteras y vivencias que tuvimos en estos años; gracias choncha.

Agradezco a **Diana Juana Maria Pérez Cisneros**; por su amistad y apoyo, por sus momentos compartidos, y por ser un apoyo importante durante toda mi carrera para seguir, por ser alguien especial; gracias Diana.

Agradezco a Imir “compadre”, David “enano”, Gamma, Lalo “niño”, Cesar “chechar”, Sergio “checo”, Francisco “cachorro”, Machuca “negro”, Nuyen, Daryela, Iris, Concepción “conchis”, Carmen “seño”, Guadalupe “lupis”, Nancy, Daniel “cannabis”, Daniel “chilupis”, Hector “gordo”, Violeta “vaio”, Adriana, Irleth, Gabriela, Ana “huerfanita”, Patricia “paty”, Yuridia, Jose “pepe”, Julio “chichiá”, Roberto “beto”, Herman “henry”, Xochitl, Juan “cabo”, Esperanza “pera”, Bey, Raul “rulis”, Lalo “piporro”, Mario, Ruth, Armando, Susana “susy”, Tania “taniazota”,

Araceli, Liliana "lily", Adalberto "don beto", Marco, A la raza de 9° semestre de alimentos y a todas aquellas personas que me ayudaron de alguna manera u otra en lo personal para acabar con este sueño; Gracias.

Y a toda la gente que no creía en mi.....ahí esta, lo he logrado.

DEDICATORIAS.

Dedico este trabajo a **Dios** por haberme creado y por darme a las personas que necesito a mi alrededor para poder existir; gracias dios.

A mi mama **Marcela Villa Rodríguez**, te agradezco mami todo lo que has hecho por mi, lo que has realizado en mi, por darme la vida, por todo tu cariño; aunque a veces incomprendido por mi, pero, tu siempre estabas ahí mama, te quiero mucho; gracias por ser el pilar de todos nosotros y se me llena la boca de orgullo con solo decir que tu eres mi madre. Gracias.

A mi papa **Zenon Carlos García**, por dejarme entrar a su vida, por darme su cariño, por aceptar aquel abrazo que le di hace años y que supe desde ese momento que yo era su sangre y lo seguiré siendo; te quiero mucho papa. Gracias.

A mi hermana **Liliana García Villa**, por todo su cariño, por todos los momentos que hemos compartido desde que ella esta presente en este mundo, desde que la he visto crecer; sin ella hubiera sido aburrida gran parte de mi vida, gracias mensa. Te quiero mucho.

A mi hermana **Vanessa García Villa**, por ser el ángel que nos ha caído a la familia y darle una luz extra a todos nosotros y revivir aun mas la unión familiar de todos, gracias mensilla. Te quiero mucho.

A mi pequeña luz, un pedazo de alma de mi ser, que ojala pueda aprender y sentir algún día de todas las tristezas y alegrías que sienten los padres y que gracias a el, ahora no andaré solo, porque también esta él conmigo. Gracias **Leonardito**, te quiero mucho hijo.

A ti, por ser un ángel que cayo del cielo para mi, por quitarme la lluvia de mis ojos y poner una sonrisa siempre, por ser como eres, por todo el cariño que me has dado, por aceptarme con todas mis alegrías y tristezas; Te amo **Janeth**.

A todos mis tíos (**Ro, Esther, Isabel, Mirna, Claudia, Carla, Chucho, Carlos, Hugo**), primos, abuelitos (**Dora y Lazaro**); en especial a mi abuelita **Maria Cristina Rodríguez Lerdo de Tejada** por que ella así como es de reacia y fuerte, así también de cariñosa y alegre, me ha apoyado en todo.

INDICE

1. AGRADECIMIENTOS.....	3
2. DEDICATORIAS.....	5
3. RESUMEN.....	9
4. ABSTRACT.....	10
5. INTRODUCCION.....	11
6. OBJETIVOS GENERALES.....	13
6.1 Objetivos especificos.....	13
7. JUSTIFICACION.....	14
8. ANTECEDENTES.....	15
8.1 Taninos.....	15
8.1.1 Taninos hidrolizables.....	16
8.1.2 Taninos condensados.....	17
8.1.2.1 Antocianinas.....	19
9. MATERIALES Y METODOS.....	25
9.1 Obtencion del material vegetal.....	25

9.1.1	Garambullo.....	25
9.1.2	Cuautecomate.....	26
9.1.3	Berenjena.....	27
9.1.4	Café.....	27
9.1.5	Uva.....	28
9.1.6	Mora.....	29
9.2	Selección del material vegetal.....	29
9.3	Extraccion de taninos con acetona.....	30
9.4	Cauntificacion de fenoles totales (Folin-Ciocalteu).....	31
9.5	Extraccion de la acetona.....	31
9.6	Metodologia para procianidinas.....	32
9.7	Analisis HPLC.....	33
9.8	Efecto del pH sobre el color.....	34
9.9	Efecto de la temperatura sobre el color.....	35
9.10	Efecto de la luz sobre el color.....	36
10.	RESULTADOS.....	37
10.1	Fenoles totales.....	37
10.2	Taninos Condensados.....	39
10.3	Prueba de temperatura.....	42
10.4	Prueba de pH.....	46
10.5	Prueba de luz.....	52
10.6	HPLC.....	53
11.	CONCLUSIONES.....	59
12.	BIBLIOGRAFIA.....	60

RESUMEN.

Se estudiaron 7 muestras vegetales para determinar la cantidad de taninos totales, taninos condensados, además de evaluar el contenido de antocianinas, en especial la pelargonidina; las muestras utilizadas fueron: cuautecomate, garambullo, pulpa de café, mora, berenjena, cutícula de uva y semilla de uva. Para lo anterior se realizaron varias pruebas y evaluaciones (Folin-Ciocalteu, HCl-Butanol y HPLC). También se determinó el grado de degradación ante pruebas químicas (pH, Luz y Temperatura). Se observó mayor contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Se verificó que existe un mayor contenido en mora, cutícula de uva y pulpa de café a comparación en berenjena y cuautecomate. El contenido de taninos condensados por el método de HCl-Butanol se reflejó un contenido alto en las muestras de cutícula de uva y semilla de uva y valores muy bajos en berenjena y cuautecomate. En pruebas de pH se observó que la semilla de uva y la cutícula de uva presentaron más variación de color que las muestras de berenjena, garambullo y cuautecomate. En cambio cuando se realizaron las pruebas de Temperatura se presentó un mayor cambio de color en semilla de uva, cutícula de uva y pulpa de café, al contrario de las muestras de berenjena y cuautecomate los cambios fueron casi nulos. Los cambios de luz afectaron más las muestras de semilla de uva, cutícula de uva y pulpa de café sin embargo en las muestras de berenjena y cuautecomate el cambio fue mínimo.

ABSTRACT.

7 vegetable samples have been studied to know the quantity of total tannins, condensed tannins and between them to evaluate the content of anthocyanins; the used samples are: cuautecomate, garambullo, flesh of coffee, default, aubergine, cuticle of grape and seed of grape. For it there were done to them several tests and evaluations (Folin-Ciocalteu, HCl-Butanol and HPLC). Also to see his degree of degradation before chemical tests (pH, Light and Temperature). I observe that in the method of total tannins (Folin-Ciocalteu) there is a major content in default, cuticle of grape and flesh of coffee, but, a low content in aubergine, cuautecomate. As for the content of condensed tannins (HCl-Butanol) one saw that there is a high place contained in the samples of cuticle of grape and seed of grape, but very low values in aubergine and cuautecomate. In tests of pH I observe that the seed of grape and the cuticle of grape had mas variation of color that the samples of aubergine and cuautecomate. The analyses of Temperature I verify a major change of color in the materials of garambullo, cuticle of grape; unlike the samples of aubergine and cuautecomate that presented almost void changes. The analysis

of light, one saw marked change in the samples of garambullo and cuticle of grape, nevertheless in the samples of aubergine and cuautecomate the variations were small.

INTRODUCCION.

El color es el atributo de primer impacto a la vista del consumidor. La industria alimentaría ha dependido en gran parte de productos obtenidos por síntesis química, que poco a poco están siendo desplazados por productos naturales. El color representa una parte esencial en el desarrollo del hombre, en sus diversas manifestaciones sociales, culturales, ambientales, etc. Se basa en una serie de procesos físicos, químicos, fisiológicos y psicológicos.

Las sensaciones que percibe el hombre cuando observa un objeto en particular las asocia con las cosas que las rodea, esto se manifiesta especialmente con los alimentos, donde la relación entre el color y el sabor son muy importante para que el consumidor adquiera un producto.

De acuerdo a su procedencia u origen, los colorantes son obtenidos por fuentes naturales, ya sean a partir de microorganismos, vegetales, animales ó minerales y también por fuentes químicas. (García Garibay, 2002)

Los colorantes naturales en la industria alimentaría están asociados aquellos que cumplen una función antioxidante y se les han llamado alimentos funcionales. Aunque todavía no hay una definición aceptada universalmente para este tipo de alimentos, el International Life Science Institute (ILSI) establece que se puede considerar que un alimento es funcional si se logra demostrar satisfactoriamente que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, que mejora el estado de salud y de bienestar, o bien que reduce el riesgo de una enfermedad. (Rodríguez Comesaña, 2001).

Los compuestos fenolicos obtenidos de las plantas contienen diversas capacidades antioxidantes, anticarcinogenas, reducen desordenes cardiovasculares, disminuyen la presión sanguínea, ayudan a combatir la arteriosclerosis, etc. En los compuestos polifenolicos encontramos ácido galico, monómeros de flavonoides como catequina, epicatequina, galato de epicatequina y dimeros, trimeros y polímeros de catequina y epicatequina, etc (Meyer y col, 1997). Los polifenoles en todos los estudios realizados con anterioridad son considerados por su capacidad biológica como componentes activos dado su fuerte capacidad de eliminar radicales libres que son responsables de reacciones de oxidación, dañando el ADN así como también en las membranas de células humanas causando formación de peróxidos provenientes de lípidos y formando productos tóxicos para el organismo humano (Galvano Fabio, 2004).

El presente trabajo tiene como finalidad determinar el contenido de antocianinas en diferentes frutos para su posterior aplicación en alimentos.

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Extraer, caracterizar y evaluar la estabilidad de antocianinas de fuentes vegetales no comunes para su posible aplicación como aditivos nutraceúticos alimentarios.

Objetivos Específicos.

- Extraer y cuantificar compuestos polifenólicos en un sistema de separación sólido-líquido usando fuentes vegetales no convencionales.

- Cuantificar el contenido de antocianinas en los extractos obtenidos.
- Evaluar el efecto de la temperatura, luz y pH sobre la estabilidad de color de los extractos ricos en antocianinas obtenidos.
- Analizar por HPLC el contenido de pelargonidina en los extractos obtenidos.

JUSTIFICACIÓN.

En la actualidad la sociedad esta demandando alimentos funcionales que además de nutrir, ayude al organismo para su óptimo funcionamiento. Así mismo se tiende a la utilización de productos naturales en los alimentos para sustituir los sintéticos, los cuales se les relaciona muchas veces como compuestos que pueden llegar a ser cancerigenos al paso del tiempo ó con dosis elevadas de estos compuestos.

Las muestras vegetales utilizadas en este proyecto, no son utilizadas en gran proporción por la industria alimentaría (a excepción de la uva), por lo que podría representar una nueva alternativa como fuentes de antocianinas, colorantes y antioxidantes.

Como hemos reiterado, por ser vegetales no tan utilizados en la dieta humana, se pueden usar como fuentes importantes de compuestos polifenolicos. Es importante resaltar el estudio de compuestos polifenolicos en muestras no tan estudiadas que se encuentran en México, tales como el cuautecomate y garambullo.

Los desechos agroindustriales no son muchas veces reutilizados para realizar subproductos de los mismos por lo que el estudio de estos químicamente representaría una forma de crear nuevos productos o innovar los ya existentes.

ANTECEDENTES.

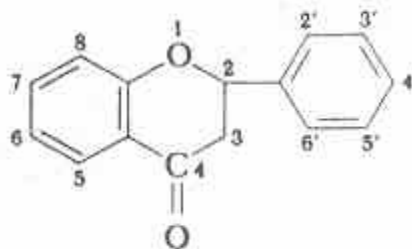
Taninos.

Este termino fue introducido en el siglo XVIII para definir sustancias orgánicas, fenolicas y solubles en agua, presentes en extractos de hojas, cortezas, maderas y frutas; capaces de curtir pieles convirtiéndolas en cueros impermeables que son resistentes al ataque de bacterias, al calor y a la abrasión.

Son compuestos que se oxida al contacto con el aire, es inodoro y de sabor agrio, soluble en agua, alcohol y acetona; reacciona con el cloruro férrico y otras sales; es combustible con un punto de inflamación de 199°C, una temperatura de autoignición de 528.5°C; poco tóxico por ingestión o inhalación.

Los taninos se definen como compuestos polifenolicos de peso molecular que oscila entre 500 y 3000 daltons y que contienen suficientes grupos hidroxilos para precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas por formación de enlaces cruzados muy estables. La formación de uniones efectivas con las proteínas y con otros polímeros como la celulosa y la pectina, es lo que hace la diferencia entre los taninos y otros compuestos fenolicos. (López Ríos, 1990)

La estructura de los taninos es similar al esqueleto correspondiente al de los flavonoides (polihidroxifenoles) como se muestra en la figura 1.



Food
chemistry,
1990.

Flavona

Los taninos se dividen en dos grupos:

- Taninos hidrolizables.
- Taninos condensados.

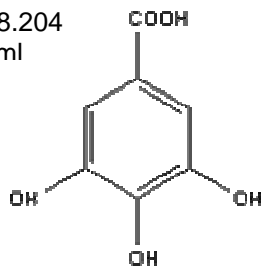
Taninos Hidrolizables.

Están constituidos por esterres de glucosa u otros polioles, ácido elagico, digalico, m-digalico, hexahidroxidifenico ó sus congeneres.

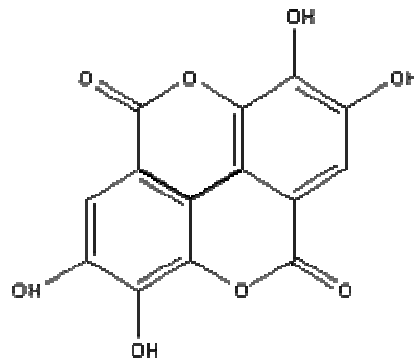
Por hidrólisis con ácidos y bases y algunos casos enzimas hidrolíticas se rompe el enlace glucosídico para liberarse azúcar y los compuestos fenólicos que lo integran. De acuerdo a esto se agrupan en:

1. Galotaninos. Se encuentran en diversas plantas vegetales. Por hidrólisis dan ácido galico (+ azúcar).
2. Elagitaninos. Se obtienen de vegetales como. Por hidrólisis dan ácido elagico (+ azúcar) ó un derivado como hexahidrofénico. (Mueller-Harvey, 2001).

<http://148.233.168.204/nfnm/Taninos.html>



ácido gálico

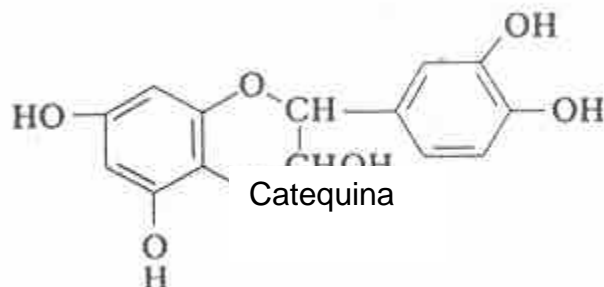


ácido elágico

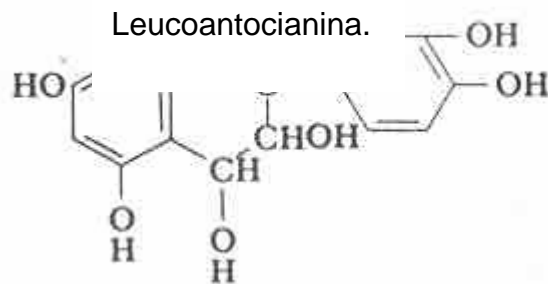
Figura 2. Estructura de taninos hidrolizables.

Taninos Condensados.

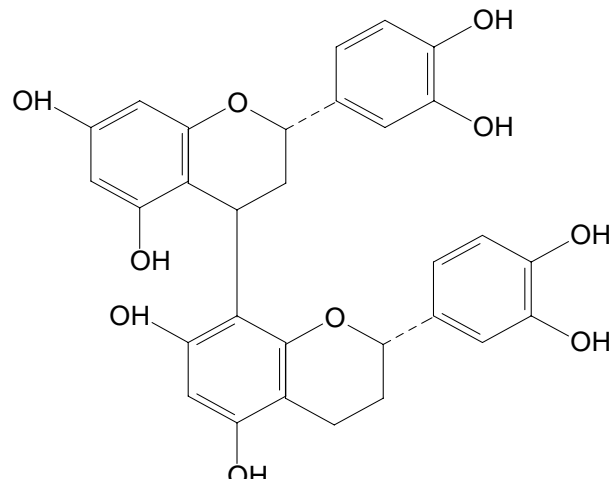
Estos compuestos son llamados también proantocianidinas. Son polímeros de flavan 3-ol (grupo de catequinas) y de flavan 3-4 diol (grupo de leucoantocianidinas). Su contenido de carbohidratos es muy bajo y casi nulo. Por ser polímeros grandes tienen un alto peso molecular (1000 a 3000 daltons), lo que le da una relativa inmovilidad. Los monómeros de catequina y leucoantocianidinas se condensan y forman enlaces principalmente entre C-4 y C-6 para formar polímeros (López Ríos 1990).



Food
Chemistry,
1990



Leucoantocianina.



A.N. Pell,
2001

Proantocianidina.

Figura 3, 4 y 5.

Antocianina, Proantocianidina.

Antocianinas.

Las antocianinas son pigmentos rojizos y azules, ampliamente distribuidas en el reino vegetal, ampliamente distribuidas en el reino vegetal, son las sustancias responsables de los colores de la mayoría de las frutas (uvas, fresas, frambuesas, moras, arándanos, manzana rosa y maíz de la India),. En la naturaleza, se encuentran en el color de las yemas y los embriones jóvenes, y a los colores rojos y azules de frutas, vegetales y flores (Nielsen Karina, 2001).

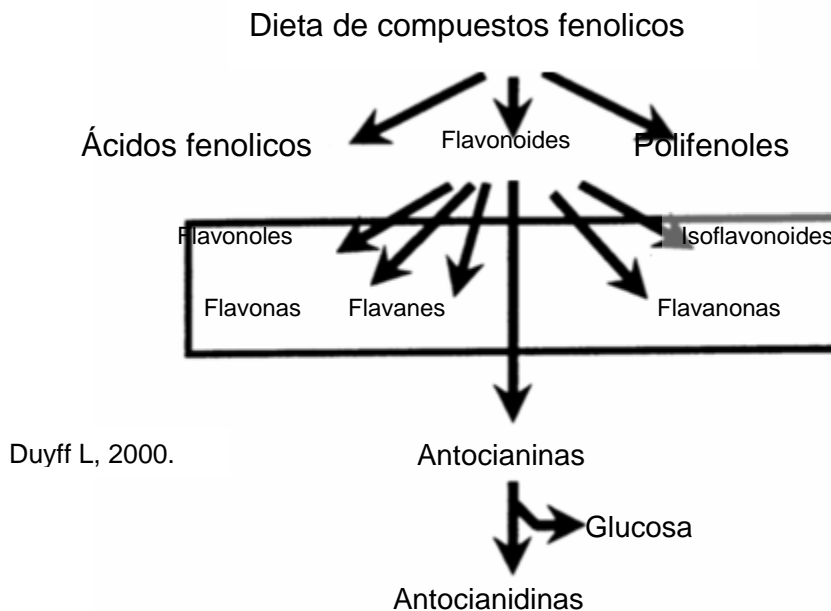
Las antocianinas utilizadas como colorantes alimentarios deben obtenerse de vegetales comestibles. La fuente más importante a nivel industrial son los subproductos (hollejos, etc.) de la fabricación del vino. Las antocianinas son los colorantes naturales del vino tinto, y en algunos casos permiten distinguir químicamente el tipo de uva utilizado. Son, evidentemente, solubles en medio acuoso. El material extraído de los subproductos de la industria vinícola, denominado en ciertas partes "enocianina", se comercializa desde 1879, y es relativamente barato. Las otras antocianinas, en estado puro, son muy caros (Rodríguez Comesaña, 2001).

Son un grupo de polihidroxi-flavan-3-ol oligómeros y polímeros ligados en carbón-carbón entre varias subunidades de flavones. La reactividad de las procianidinas con moléculas de significancia biológica ha sido importante a nivel nutricional y psicológico (A.N. Pell, 2001).

El monómero de catequina tiene centros asimétricos en las posiciones 2 y 3 en el anillo C. Aunque las variaciones en su estereoquímica se presentan en los taninos naturales.

Las Antocianinas son glicosidas solubles en agua. De polihidroxil y polimetoxil derivadas de sales 2-fenilbenzopropil o flavilio. Estas antocianinas se diferencian de manera individual por el número de grupos hidroxilo, la naturaleza, el número y la posición (ubicación) de azúcar conectado al azúcar en la molécula. Varios cientos de antocianinas han sido aisladas y químicamente caracterizadas por instrumentos espectrométricos; ha sido encontrados estas cianidinas y sus derivados (Galvano Fabio, 2004).

Los flavonoides son agrupados en antocianinas y antoxantinas. Las antocianinas son un grupo largo de flavonoides; su correspondiente aglicón es llamado antocianidina.

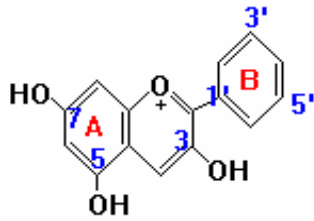


Duyff L, 2000.

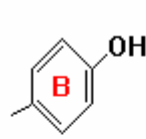
Figura 6. Derivados de compuestos fenolicos.

Se conocen 20 tipos de antocianinas, pero solo 6 son importantes en el área de alimentos: cianidina, pelargonidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina (Badui Dergal, 1996).

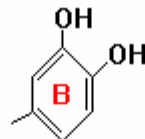
A continuación se presentan sus estructuras químicas. Esta es la estructura básica de las antocianinas y sus 6 principales.



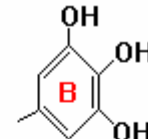
3' siempre están presente glucosa, galactosa, ramnosa, etc.
5' algunas veces glicosilasas de glucosa.
7' raramente glicosilasas de glucosa.



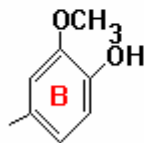
Pelargonidina



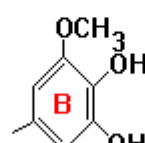
Cianidina



Delfinidina



Peonidina



Petunidina



Malvidina

<http://www.hort.purdue.edu/ses/HORT301/ANTHO/ANT>

Figura 7. Estructura química de las principales antocianinas.

Para observar de donde se forman a continuación se presentara la biosíntesis de las antocianinas.

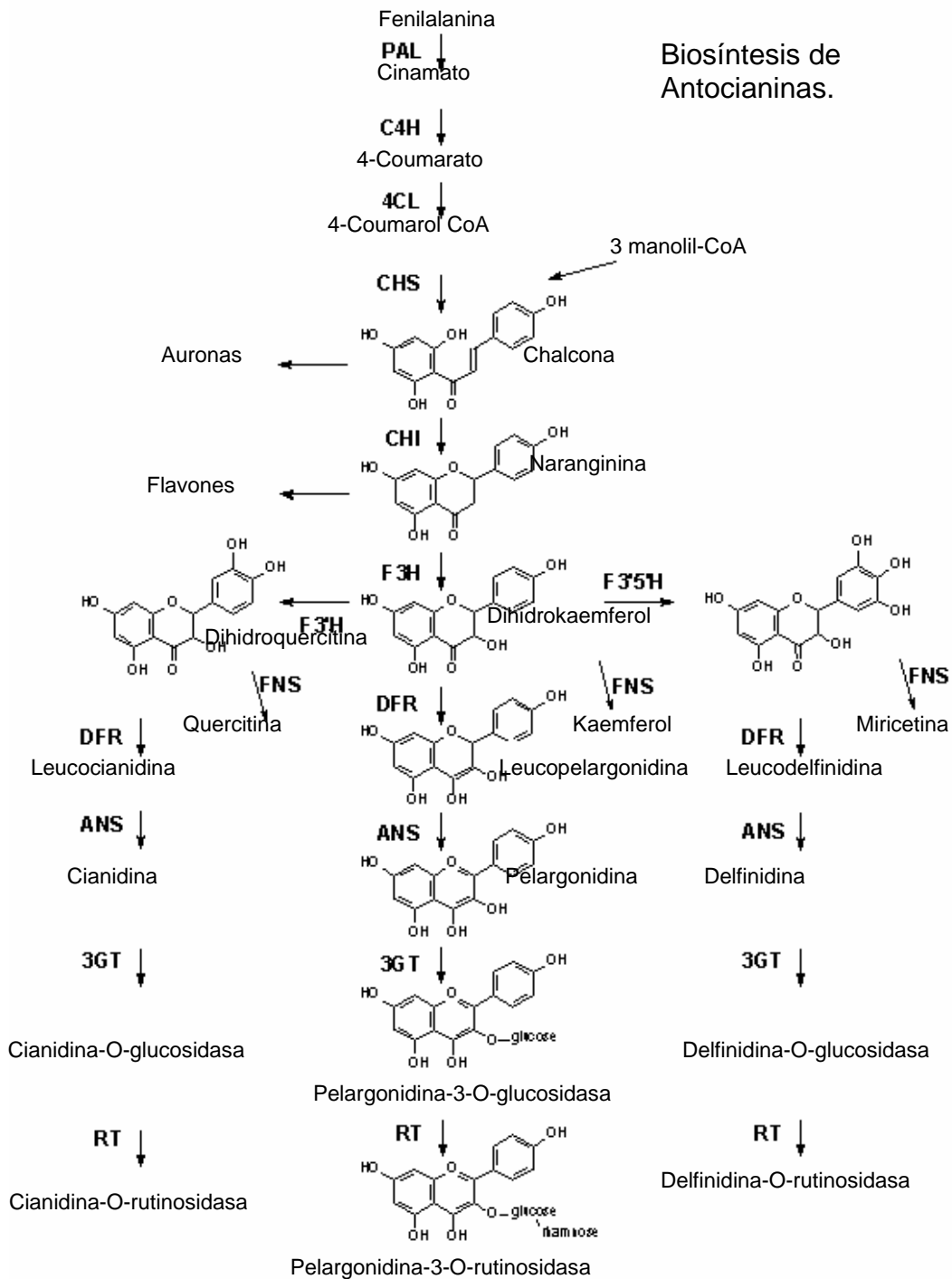


Figura 8. Síntesis de antocianinas.

Las antocianinas tienen diversos factores en contra, dado que se pueden desnaturalizar, por ser un pigmento natural, no tienen el mismo rendimiento que

un colorante obtenido de manera artificial, los principales problemas para conservar el color de las antocianinas se presentan por efecto de: (García Garibay, 2002).

- I. pH: Los cambios en el pH provocan una transformación estructural en las antocianinas. Los cambios fisiológicos en la maduración de los frutos llevan consigo variaciones en el pH y, por lo tanto, cambios de color en el tejido vegetal. Las antocianinas se transforman en su color desde pH 1-7, que abarca la mayoría de los alimentos. Estos cambios estructurales con respecto al pH incluyen la formación de la sal de flavilio, la de la base anhidra y la de la base del carbinol. A un pH entre 2-4 la principal vía de degradación térmica es la hidrólisis de la molécula del azúcar.
- II. Agua: El pigmento es soluble en agua.
- III. Oxígeno: Son inestables en presencia de oxígeno.
- IV. Iones metálicos: Con iones monovalentes como el sodio y el potasio o bien con iones divalentes como el calcio y el magnesio, las antocianinas cambian de color.
- V. Ácidos orgánicos: Son inestables en presencia de ácido ascórbico.
- VI. Enzimas: Las enzimas que tienen un carácter de β -glucosidasa hidrolizan el enlace glucosídico en el C-3, produciendo el correspondiente aglucon, el cual es inodoro.
- VII. Temperaturas: Son Termolabiles.

MATERIALES Y METODOS.

Obtención del material vegetal.

Las muestras vegetales como la mora y cuaitecomate se consiguieron en el Distrito Federal en el mercado de la Merced; Las muestras de garambullo en Guanajuato. La uva (semilla de uva como subproducto) y berenjena en la central de abastos de Saltillo, Coahuila; la muestra de pulpa de café se trajo del Estado de Veracruz.

1.- Garambullo.

Planta de la familia de las cactáceas, llega a medir más de 4 m de alto. El fruto (Figura 8) es carnoso, rojo oscuro, pequeño (de 1-2 cm de diámetro) y sin espinas. Florece y da frutos de Abril a julio. El fruto se usa para preparar refrescos, mermeladas y en forma de pasas. (Rivas Martínez, 1990),

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta

Clase	Magnoliopsida (Dicotiledoneae)
Familia	Cactaceae (Cactáceas)
Nombre científico (género y especie)	Myrtillocactus geometrizans



[http://www.Registro - Garambullo.htm](http://www.Registro-Garambullo.htm)

2.- Cuautecomate.

Árbol de 5 a 14 mts. de altura, flores de color amarillo-verdoso; frutos globosos, ligeramente aplanados de aproximadamente 10 cm de diámetro, con cubierta dura y pulpa negrusca (Figura 9), en el interior contienen abundantes semillas aplanadas. El fruto y la semilla contienen: Beta caroteno, calcio, carbohidratos, grasas, fibra, heterósidos, hierro, leucoantocianinas, niacina, ácido oleico, fenoles, fósforo, proteínas, riboflavina, tiamina, terpenoides, y agua. (<http://www.registro-cuautecomate/salud.htm>)

Nombre Científico	<i>Crescentia alata</i>
Familia	Bignoniaceae



3.- Berenjena.

Originaria de las zonas tropicales y subtropicales asiáticas. Fue en el siglo XVII cuando se introdujo en la alimentación, tras ser utilizada en medicina para combatir inflamaciones cutáneas y quemaduras. El fruto es una baya alargada o globosa, de color negro, morado, blanco, blanco jaspeado de morado o verde. (Figura 10). (<http://www.infoagro.com/elcultivodelaberenjena>)



Agua (%)	92
Carbohidratos (g)	2.20-2.49
Proteínas (g)	0.90-1.24
Grasas (g)	0.18-0.40
Fibra (g)	2.00-2.82
Valor energético (kcal)	15.00-17.08

4.- Café.

Para este proyecto, se decidió incluir la pulpa de café, dado que es un residuo agroindustrial de valor agregado; solamente se tienen reportes de su utilización como abono y como nutriente para la lombricultura, pero las cerezas del café contienen todos los nutrientes que la planta absorbe del suelo.

El arbusto es de 4,6 a 6 m de altura en la madurez. El fruto se desarrolla en el curso de los seis o siete meses siguientes a la aparición de la flor; cambia desde el verde claro (Figura 11) al rojo cuando está totalmente maduro. (Covarrubias Alvarez, 1994)

Familia	Rubiáceas
Genero	Coffea



5.- Uva.

Nombre que se le da al fruto de algunas especies que pertenecen al orden de ramnáceas (Figura 12). Las parras son tallos que trepan a lo largo de muros y vallas; las hojas, de nerviación palmada, aparecen opuestas sobre las ramas; el fruto se forma en vides de 2 años, que se corta después de la recolección. (Encarta 2003)

Familia	Vidaceas
Genero	Vinifera



Lipidos	1 g
Colesterol	0 mg
Sodio	0 mg
Carbohidratos	22 g
Fibra	1 g
Proteínas	1 g
Calorias	76cal

6.- Mora.

El fruto maduro, llamado mora, es un agregado de pequeñas drupas de color púrpura oscuro unidas a un receptáculo cónico que se separa fácilmente de la

planta (Figura 13), su uso es principalmente para elaboración de mermeladas y bebidas (Encarta 2003).

Familia	Moráceas
Genero	Morus



% Humedad	84.0 - 84.70
% Grasa	0.11 - 0.13
%Carbohidratos	4.60 - 4.80
% Fibra	1.36 - 1.38
%Cenizas	0.20 - 0.57

Selección del material vegetal.

A estos se les hizo una inspección organoléptica con el fin de verificar que todos los materiales estuvieran en buen estado (maduración, color, textura, ausencia de microorganismos, daño de manejo, etc.); estos parámetros fueron evaluados; Posteriormente se lavaron los materiales para eliminar polvo y algún indicio de crecimiento microbiano. Después las muestras fueron congeladas para detener las reacciones enzimáticas y así como para evitar la pérdida de humedad.

Para el análisis las muestras se descongelaron durante una hora; en las muestras de uva se le retira la semilla para su análisis, también se realizó lo mismo a la berenjena y cuautecomate; a continuación se colocaron en charolas para exponerlas a una temperatura de 60°C durante un tiempo de 12 horas en una estufa (Felisa-Horno). Con esto evitamos la caramelización de los azúcares y se facilite su molienda).

Transcurrido ese tiempo se pasó a la molienda del material seco en un mortero y posteriormente a un almacenamiento en frascos de color ámbar (para evitar el contacto de la luz) y posteriormente se colocaron en un lugar seco.

A continuación las muestras se preparan para la extracción con acetona la cual consto de los siguientes materiales y pasos:

Extracción de taninos con acetona (70%).

Las muestras se colocaron en diferentes matraces con 50 gramos de cada una y con acetona al 70%; lo que se logra con esto es permear la membrana para extraer el pigmento interno de las células. A continuación se colocaron en las parrillas de extracción donde estuvieron a una temperatura de 60 °C y por un tiempo de 12 horas; la temperatura del agua de los condensadores se mantuvo de 6-10 °C; se cambiaron los refrigerantes cada 45 minutos para mantener a temperatura fría el agua. Después de las 12 horas de calentamiento, se procedió a vaciar el contenido de los matraces en tubos de centrifuga, los cuales se centrifugaron durante 10 minutos a 2500 rpm. Transcurrido este tiempo se separa el sobrenadante del resto del precipitado y se colocan en tubos de ensaye para su posterior refrigeración y evaluación.



Figura 14. Sistema de Reflujo.

Cuantificación de fenoles totales (Folin-Ciocalteu).

Para la cuantificación de fenoles totales así como para determinar la eficacia de la extracción de compuestos fenolicos por solventes; se uso el método de Folin Ciocalteu, el cual consistió en colocar 0.8 ml de muestra en tubos de ensaye y después se le añadió 0.8 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu.

A continuación se agito en el vortex y se dejo reposar durante 5 minutos. Después se preparo una solución de carbonato de sodio (Na_2Co_3) 0.01M de la cual a cada tubo se le agrego 0.8 ml y se dejo reposar durante 1 minuto; a continuación se les agrego 4 ml de agua destilada a cada tubo y se leyeron las muestras a una longitud de 480 nm en el espectrofotómetro. Una desventaja de este método es la formación de un precipitado que interfiere con la medición espectrofotométrica (Singleton et al., 1999).

Extracción de la acetona (Rotavapor).

Después de la cuantificación de los taninos totales, se procedió a la extracción de la acetona con el rotavapor para eliminar el solvente usado. Esto consistió en vaciar el contenido de los tubos de ensaye en matraces bola tapados con papel aluminio y colocarlos en baño maría a 60 °C; para un óptimo resultado de este método, hasta que la acetona deje de gotear, lo cual nos indica que la muestra le fue extraída totalmente el solvente utilizado.



Figura 15. Rotavapor

Metodología para procianidinas (HCl-Butanol).

El método de HCl-Butanol es comúnmente usado para cuantificar proantocianidinas solubles. Los taninos hidrolizables no reaccionan con este ensayo. (A.N. Pell, 2001)

Después de la extracción del solvente por el rotavapor, se colocaron en tubos de ensaye 20 mg ó 500 μ l de las muestras a analizar; se les adiciono 1 ml de metanol, 9.34 ml de HCl-Butanol a cada tubo y 0.66 ml de ácido ascórbico 1 mM; a continuación los tubos se colocaron en un baño caliente a ebullición por espacio de 1 hora, agitándose los tubos cada 10 minutos con el vortex durante 5 segundos. Completado el baño caliente, se enfriaron en un baño de hielo hasta que alcanzaron temperatura ambiente; después los tubos se centrifugaron a 5500 rpm durante 10 minutos; a continuación se recupero el sobrenadante y se coloco en celdillas para leer en el espectrofotómetro a una longitud de 550 nm. Nota: Si la absorbancia de la muestra es mayor de 0.75 nm, se diluye con butanol y se vuelve a leer.



Figura 16. Espectrofotómetro

Análisis HPLC.

El HPLC combinado con detección de diodos (DAD) es comúnmente el método mas usado para la cuantificación cuantitativa y cualitativamente de las antocianinas (Strack and Wray,1989).

Para este método se prepararon dos solventes; el primer solvente (A) se preparo con agua/ácido acético (9:1) y el segundo solvente (B) se preparo con acetonitrilo/agua/ácido acético (3:6:1). Después se filtraron en una membrana millipore de 0.45 μ M a vacío para eliminar impurezas presentes en estos solventes. A continuación se agitaron los solventes inyectándoles helio (gas noble) durante 10 minutos para eliminar el oxígeno presente; después se purgo la bomba para evitar que existiera aire dentro de los tubos inyectores; se verifico la presión de la columna y el calentamiento de las lámparas así como el método a seguir (Mateus N., 2001) ; en seguida se inyectó 20 μ L de cada muestra.

Efecto del pH sobre el color.

Se prepararon varias soluciones buffer, que por definición son una o varias sustancias químicas que afectan la concentración de los iones hidrógeno en el agua. Siendo que pH no significa otra cosa que potencial de hidrógenos, un buffer lo que hace es regular el pH.

Las soluciones buffer que se usaron fueron con pH de 2.2, 4, 6, 8 y 10. Para preparar el pH de 2.2 se uso 1.5 ml de glicina aforando a 100 ml (0.2 M) y 44 ml de HCl (0.2 M); todo esto aforando a 200 ml con agua destilada. Para el pH de 4 se utilizó 2.1 gr de ácido cítrico aforando a 100 ml (0.1 M) y 2.9 gr de citrato de sodio aforando a 100 ml (0.1 M); se junta 33 ml de ácido cítrico 0.1 M y 17 ml de citrato de sodio 0.1 M; todo esto aforando a 100 ml de agua destilada. Para la

obtención del buffer de 6 se toma 9.5 ml de ácido cítrico 0.1 M y 41.5 ml de citrato de sodio 0.1 M; todo esto aforando a 100 ml con agua destilada . Para el buffer de 8 se utilizo 2.78 gr de fosfato de sodio monobásico aforando a 100 ml (0.2 M) y 5.36 gr de fosfato de sodio dibasico hepta aforando a 100 ml (0.2 M); se toma 5.3 ml de fosfato de sodio monobásico (0.2 M) y 94.7 ml de fosfato de sodio dibasico hepta (0.2 M); y se aforo a 200 ml con agua destilada.



Figura 17. Buffers

Se coloco 200 μ l de muestra y 800 μ l de cada una de las diferentes soluciones. Se deajo en reposo por 5 minutos para evaluar el resultado.

Efecto de la temperatura sobre el color.

Para determinar el efecto de la temperatura en los taninos condensados se colocaron tubos de ensaye con 1 ml de cada muestra y 1 ml de agua destilada a diferentes temperaturas, las cuales fueron de 20°C, 40°C, 60°C y 80°C. Se dejaron las muestras en la s diferentes temperaturas por espacio de 30 minutos.



Figura 19. Parrillas de calentamiento

Figura 18. Baño Maria

Efecto de la luz sobre el color.

Estas tienen como objeto verificar la oxidación de las muestras con respecto al halo de luz. Estas se realizaron durante 96 horas (4 días) y se colocaron 1 ml de la muestra en cada tubo de ensaye. La lámpara se coloco a 5 cms de distancia de los tubos, la intensidad de la lámpara fue de 9 watts (127 volts). Se mantuvieron las muestras en ambiente seco.

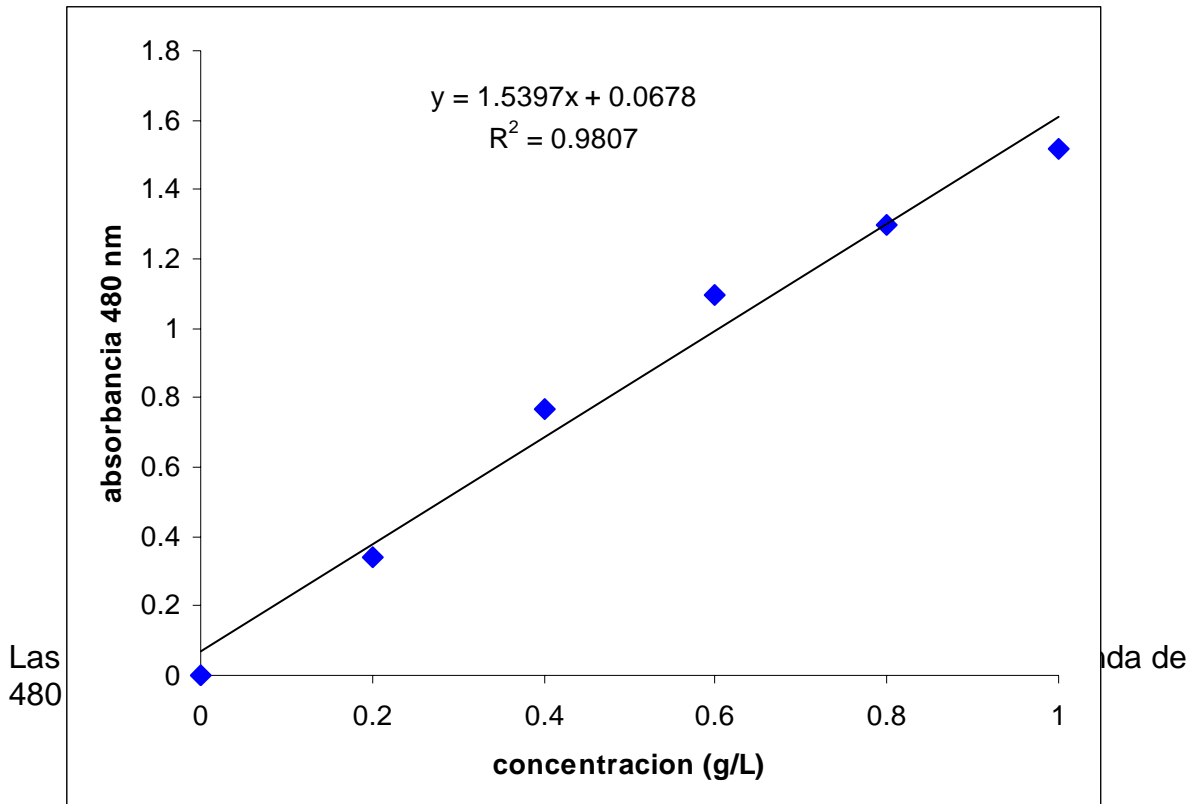


Figura 20. Lámpara de luz.

RESULTADOS.

Fenoles totales.

El método de Folin-Ciocalteu se utilizo para contabilizar fenoles totales; los reactivos usados en este método fueron el ácido fosfomolibdico y el ácido fosfotungstico. Se utilizo una solución madre de catequina (Sigma) la cual consistió de 1 gr/L (10 ml de agua destilada /0.01 gr de catequina); usando las concentraciones de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1. a una lectura de 480 nm. El cual sirvió como blanco de las muestras.



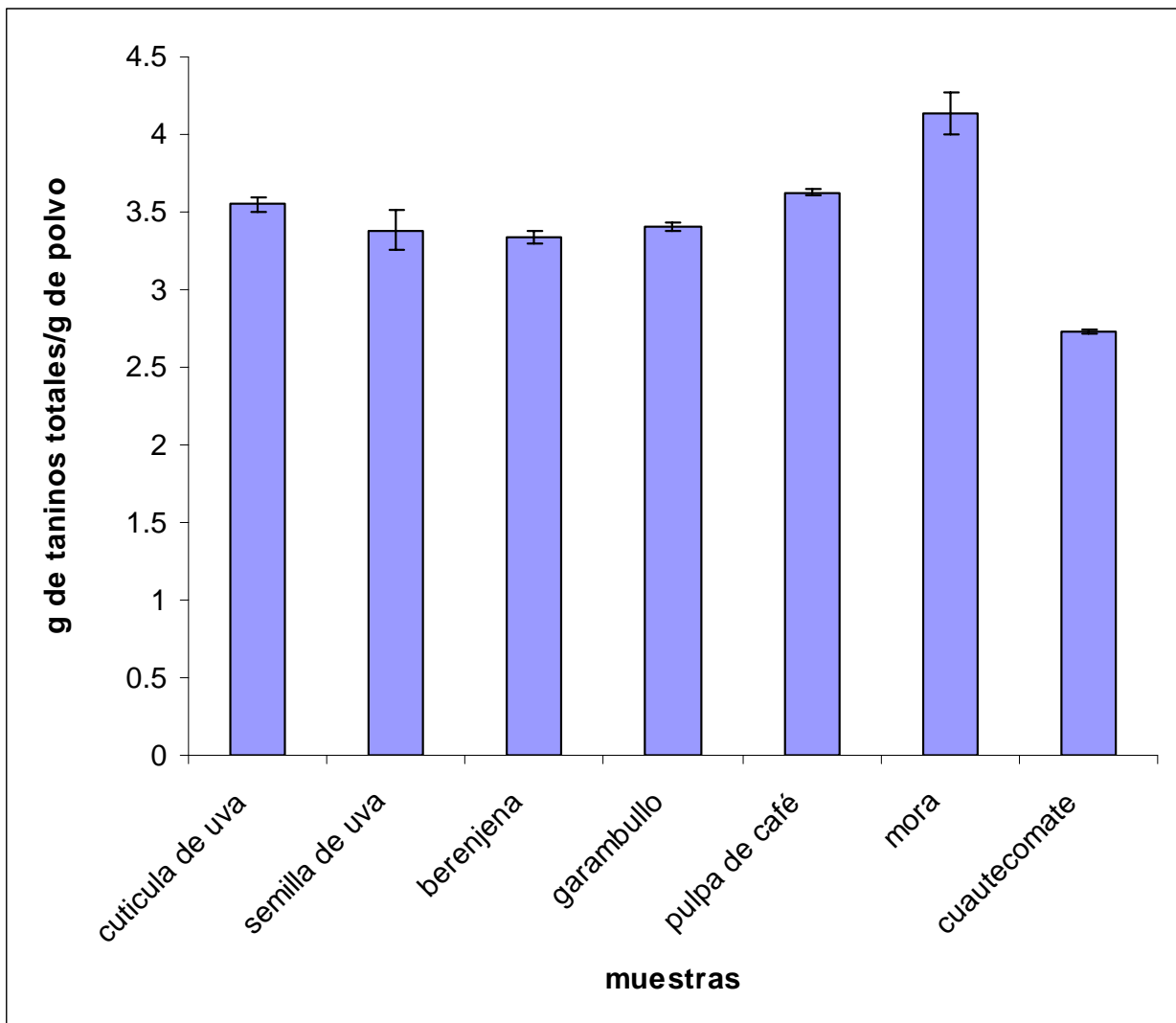


Figura 21. Se puede observar que el resultado de fenoles totales, la mayor concentración de estos se dio en la mora, mientras que en el cuautecomate se presentaron en menor grado.

Taninos Condensados.

Estos compuestos fueron determinados por el método de HCl-Butanol, además es específico para taninos condensados (Pell, 2001). La reacción que ocasiona es la siguiente (Figura 22):

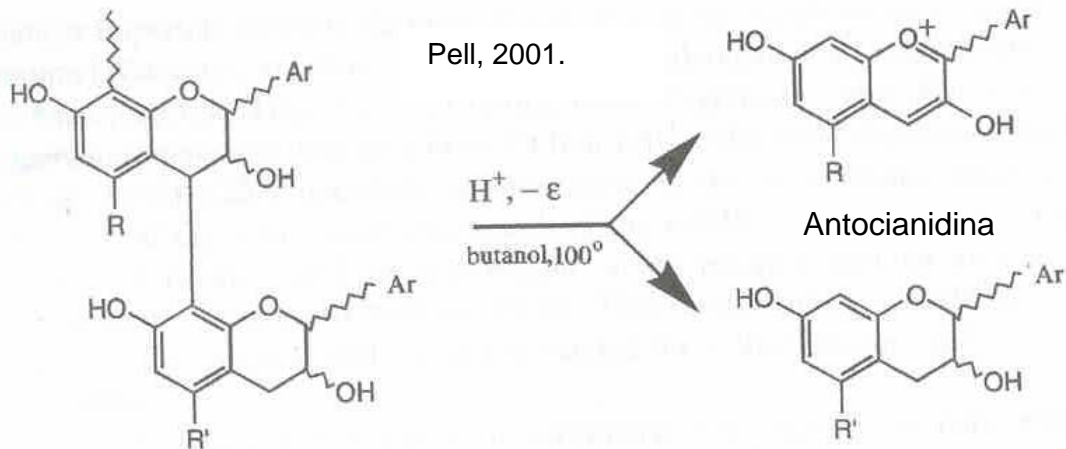


Figura 22. Aquí se muestra la reacción que provoca la adición de ácido clorhídrico.

Esta reacción envuelve reacciones de oxidación pero no da la coloración de la antocianidina. (Pell, 2001).

Los resultados obtenidos con esta técnica son para la determinación en procianidina. Para determinar las cantidades de estos compuestos se usó un blanco tratado de la manera en como se menciona en materiales y métodos; se preparó una solución madre de catequina (1:10) con concentraciones 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1. La curva patrón dio los siguientes resultados:

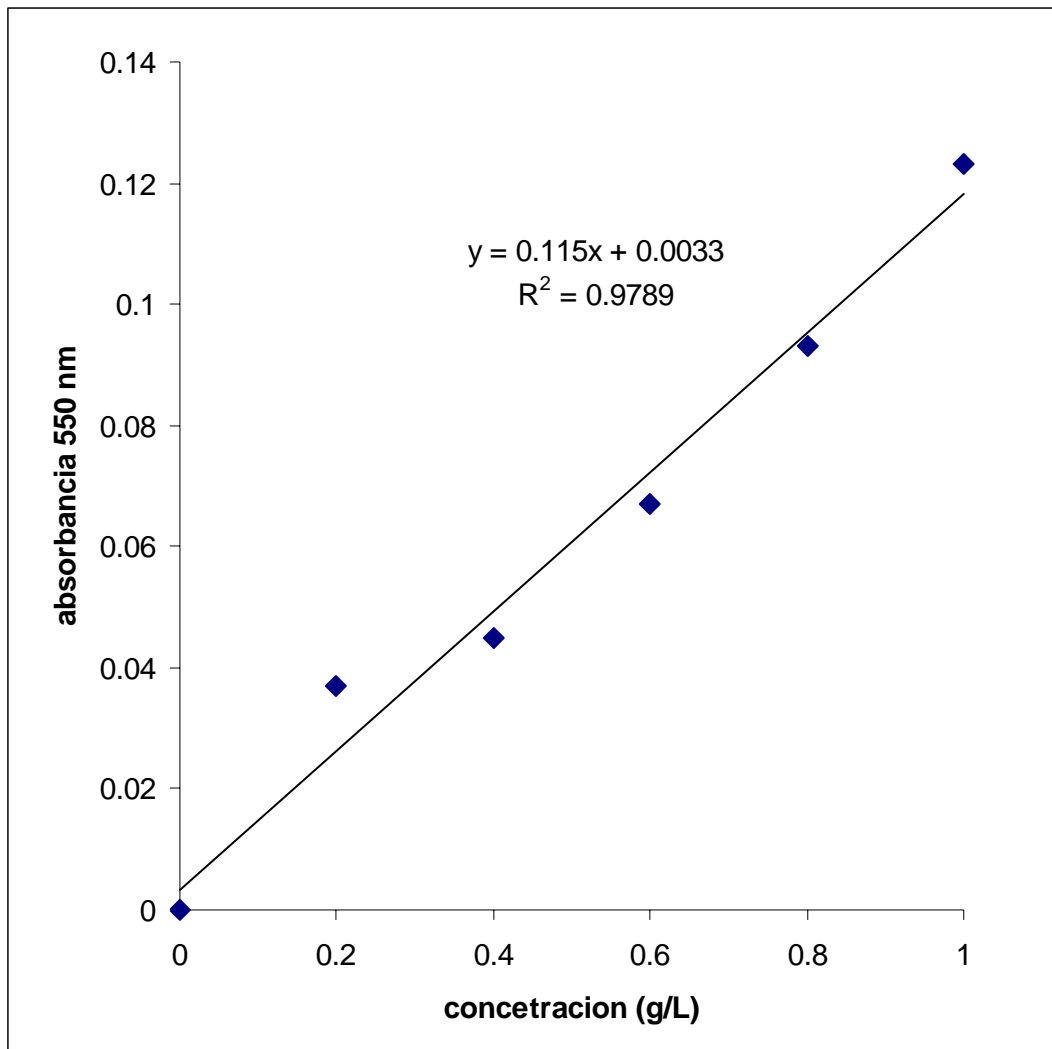


Figura 23. Curva patrón de catequina 1 gr/L bajo el sistema de HCl-Butanol.

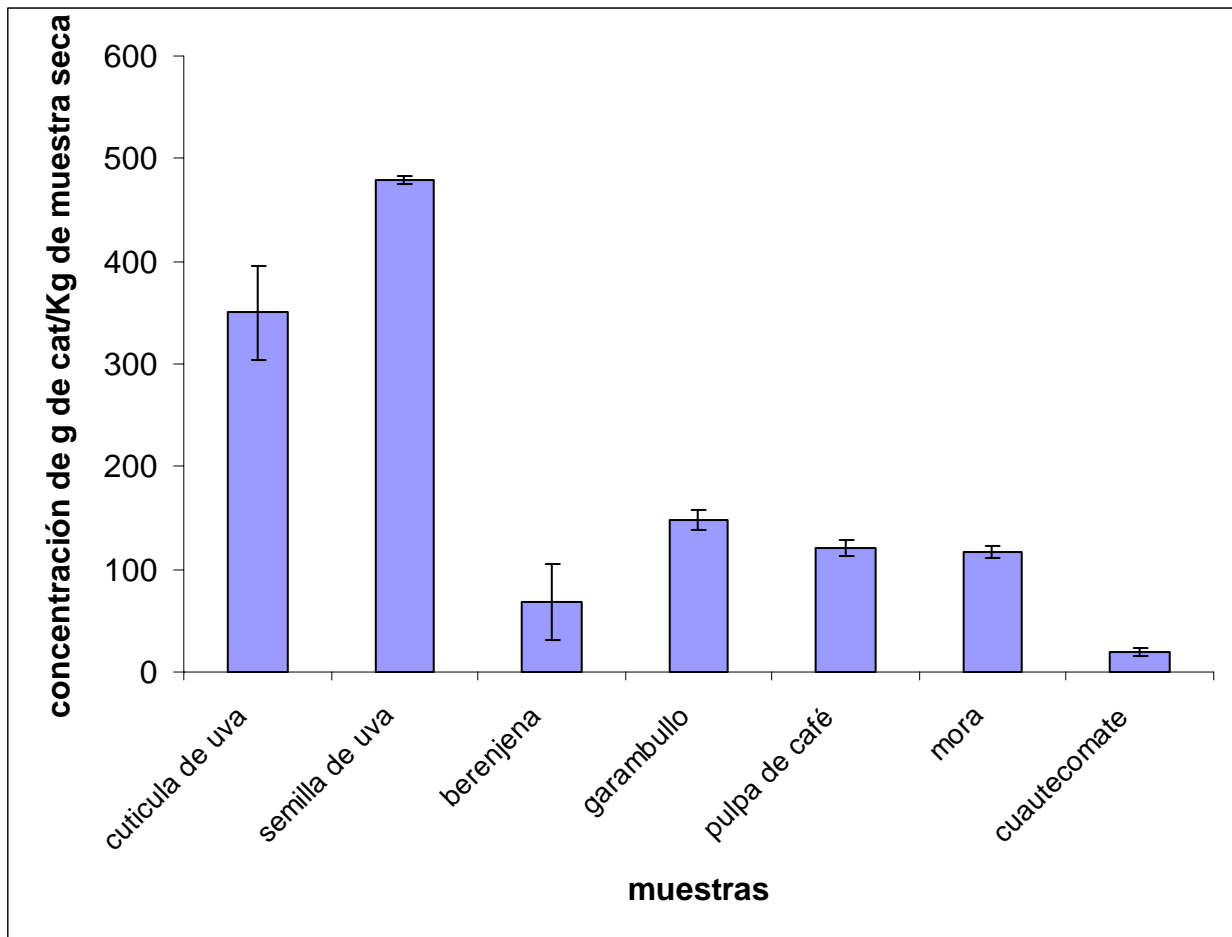


Figura 24. Considerando los resultados en gramos de cat/L de extracto y tomando en cuenta que el extracto se obtiene con 50 gr de muestra con 200 ml de acetona.

Como se puede observar las muestras de semilla de uva y cutícula de uva dieron un alto índice de procianidinas a comparación de las muestras de berenjena y garambullo las cuales fueron escasas.

Prueba de Temperatura.

La temperatura afecto de gran manera a los compuestos fenolicos, ocasionando con ello una desnaturalización en sus diversas estructuras químicas y por

40°C	
Semilla de uva.	Presenta un precipitado con un cambio de color mínimo.
Cutícula de uva.	Pequeño precipitado con obscurecimiento.
Berenjena.	No hay cambio de color.
Garambullo.	No hay precipitado con color ámbar.
Pulpa de café.	Hay turbidez con una ligera separación.
Mora.	Un pequeño precipitado con color similar.
Cuautecomate.	No hay precipitado varia muy poco el color.

consiguiente una formación de diversos compuestos alternativos de los que se buscan. Los resultados de estas pruebas se presentan de la siguiente manera:

20°C	
Semilla de uva.	Presenta un ligero precipitado / no hay cambio de color.
Cutícula de uva.	Hay un cambio de color con precipitado.
Berenjena.	No hay ningún cambio de color.
Garambullo.	Hay dispersión con un poco cambio de color.
Pulpa de café.	No hay gran cambio de color.
Mora.	Hay un pequeño cambio de color.
Cuautecomate.	Existe un pequeño cambio de coloración.



Figura 25. Muestras tratadas a 20°C

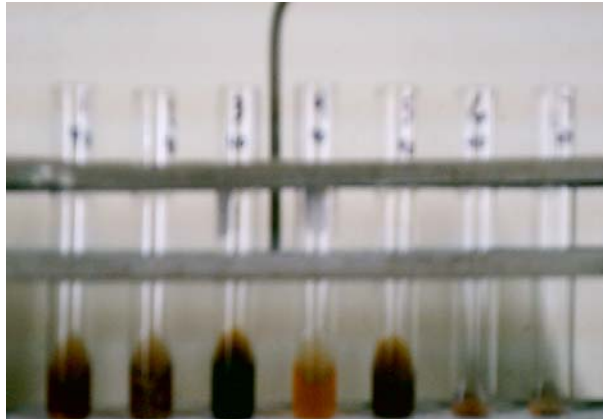


Figura 26. Muestras tratadas a 40°C

60°C	
Semilla de uva.	Aumento de color con un precipitado.
Cutícula de uva.	Casi no aparece precipitado; mantiene su color.
Berenjena.	Hay un tono negro mas preponderante.
Garambullo.	Presenta una turbidez con un color similar.
Pulpa de café.	Turbidez con color similar.
Mora.	Pequeño precipitado con color rojizo.
Cuautecomate.	Aclarimiento de color.

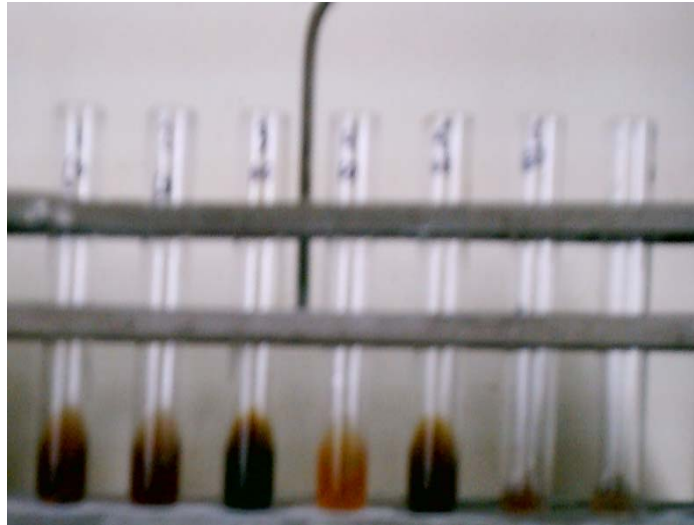


Figura 27. Muestra tratada a 60°C.

80°C	
Semilla de uva.	Casi no hay precipitado con color oscuro café.
Cutícula de uva.	No hay precipitado; hay una coloración oscura.
Berenjena.	No hay cambio.
Garambullo.	Solo se presenta turbidez.
Pulpa de café.	No hay precipitado; el color se mantuvo igual.
Mora.	No hay precipitado.
Cuautecomate.	Precipitado ligero con un color negro.

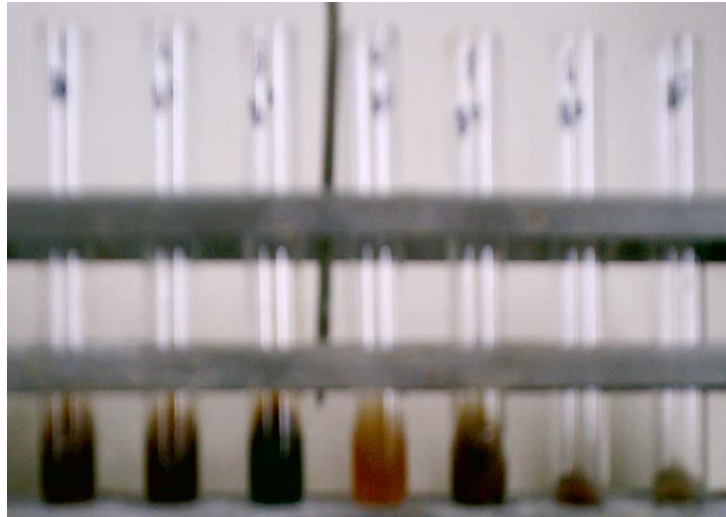


Figura 28. Muestra tratada a 80°C.

Prueba de pH.

Estas pruebas sirven para verificar el cambio de coloración en diferentes soluciones buffer, estas cambian debido a la deficiencia del núcleo de flavilio (Badui, 1996).

En este estudio los niveles de pH utilizados fueron de 2.2, 4, 6, 8 y 10.



Figura 29. Muestras sin adición de buffer. De izquierda a derecha se presenta: semilla de uva, cutícula de uva, berenjena, garambullo, pulpa de café.

Semilla de uva.

Las muestras de semilla de uva tuvieron variaciones en cuanto al color como se puede observar en la Figura 30, de izquierda a derecha las muestras se ordenan de acuerdo al nivel de pH (de menor a mayor). Se mantiene un color mas ámbar en pH de 4 y un obscurecimiento mayor en pH de 6.



Figura 30. Cambio de color en el extracto de semilla de uva debido a los cambios de pH realizados.

Cutícula de uva.

En cuanto a la cutícula de uva, se pudo observar los diferentes cambios que existen en ellos con la adición de los buffer que se prepararon. Viéndose en la Figura 31 el cambio que hay de un pH de 2.2 con respecto del pH de 10 en donde se nota un color mas oscuro.



Figura 31. Cambio de color en la cutícula de uva por el efecto del pH.

Berenjena.

Con este material se puede observar en la Figura 32 que no hay alguna alteración con respecto a su color. Por lo que se puede concluir que contiene muy poca cantidad de taninos condensados.



Figura 32. No se denota un cambio significativo en la muestra de berenjena.

Garambullo.

En lo que respecta a este material se puede comprobar como se observa en la Figura 33 que no hay una gran variación de su estructura; solamente se puede constatar que en pH de 2.2 y 8 se presenta una ligera variación.



Figura 33. Solamente se observa un pequeño cambio con respecto a su color.

Pulpa de café.

Este material vegetal, presenta variaciones dependiendo de la concentración de las soluciones a las que fue sometido. En las figura 34 se observa un cambio de coloración en pH de 2.2 con respecto al pH de 8, donde se observa un tono mas oscuro.

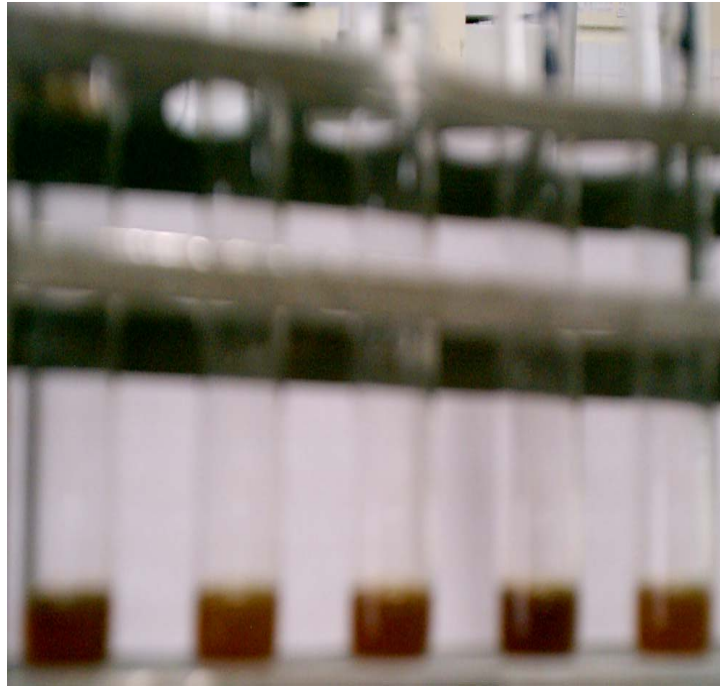


Figura 34. Se presenta un cambio menos intenso que las muestras de semilla y cutícula de uva.

Prueba de luz.

Esta prueba se realizó durante varios días y como se muestra en la figura, se puede observar claramente que existe una oxidación en todas las muestras vegetales, esta oxidación es más evidente en las muestras de semilla de uva, cutícula de uva y pulpa de café; mientras que las muestras de gámbulo, berenjena se denota que no hay una oxidación tan marcada. (Figura 35 y 36)

Figura 35. Muestras fotografiadas al comienzo de la prueba.



Figura 36. Se observa claramente las oxidaciones de todas las muestras terminada la prueba.



HPLC.

Concentraciones estimadas de antocianinas en los extractos acetonicos, usando como estándar la pelargonidina 3 glucosa (p3g):

Componente	Área (%) / Tiempo de retención (min)	Concentración (mg/L)
P3G	11.5 / 75.5	10
P3G	88 / 75.4	50
EA-BERE	1.55 / 75.6	0.9 – 1.3
EA-CUAT	15.47 / 75.8	8.8 – 13.5

EA-GARA	15.3 / 75.5	8.7 – 13.3
EA-MORA	34.8 / 75.1	19.8 – 30.3
EA-PULP	5.15 / 75.4	2.9 – 4.5
EA-CUTI	29.4 / 74.8	16.7 – 25.6
EA-SEMI	26.7 / 74.5	15.2 – 23.2

Nota: Los resultados fueron obtenidos a partir de la relación: $C_M = (C_E * A_M) / A_E$, donde C_M y C_E son las concentraciones de la muestra y del estándar y A_M y A_E son los valores de las áreas del cromatógrama de la muestra y del estándar.

Las muestras se realizaron por duplicado. Se utilizo un equipo Perkinelmer Series 200 (Modelo 2003). Las condiciones que se usaron fueron una columna Spheri-5 RP-18, 5 μ , 220 X 4.6 mm. El análisis fue llevado a cabo a 254 nm. El gradiente fue de 20-85% B durante 70 min, 85-100% B durante 5 min y después se mantuvo un punto isocratico de 10 min con un flujo de 1 mL/min.

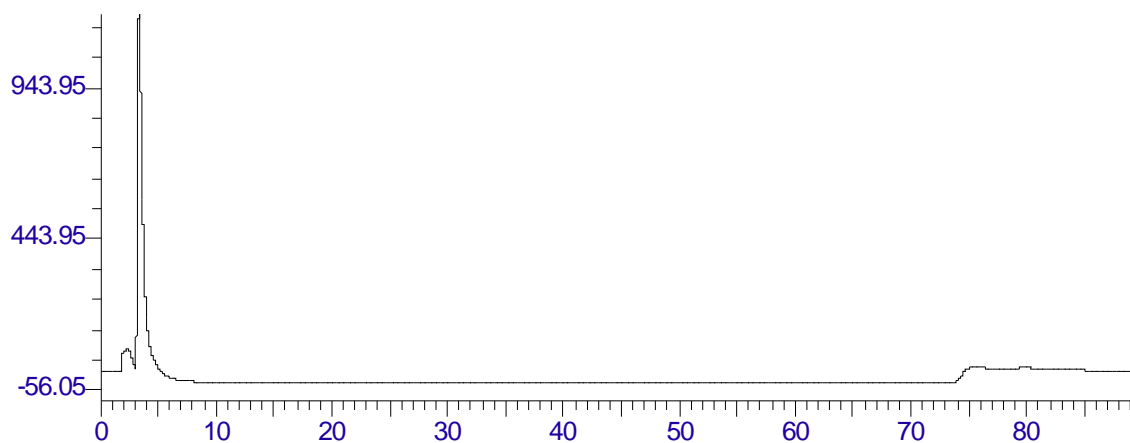


Figura 37. ACETONA

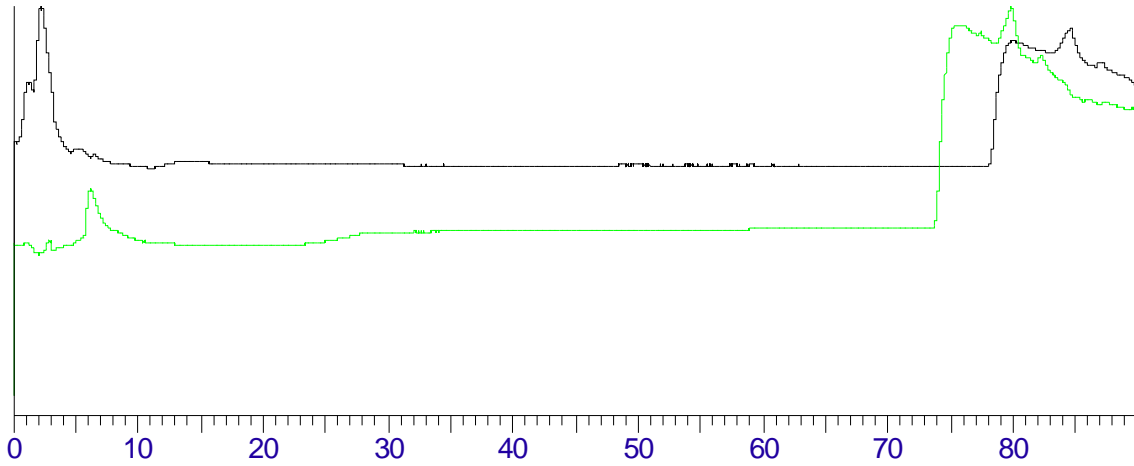


Figura 38. METANOL-ETANOL-PELARGONIDINA 50 ppm

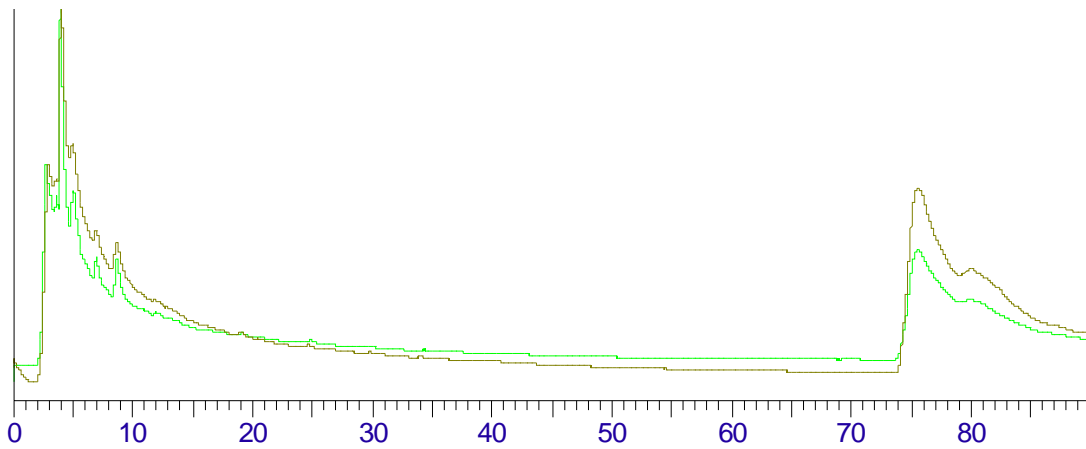


Figura 39. EXTRACTO ACETONICO DE BERENJENA

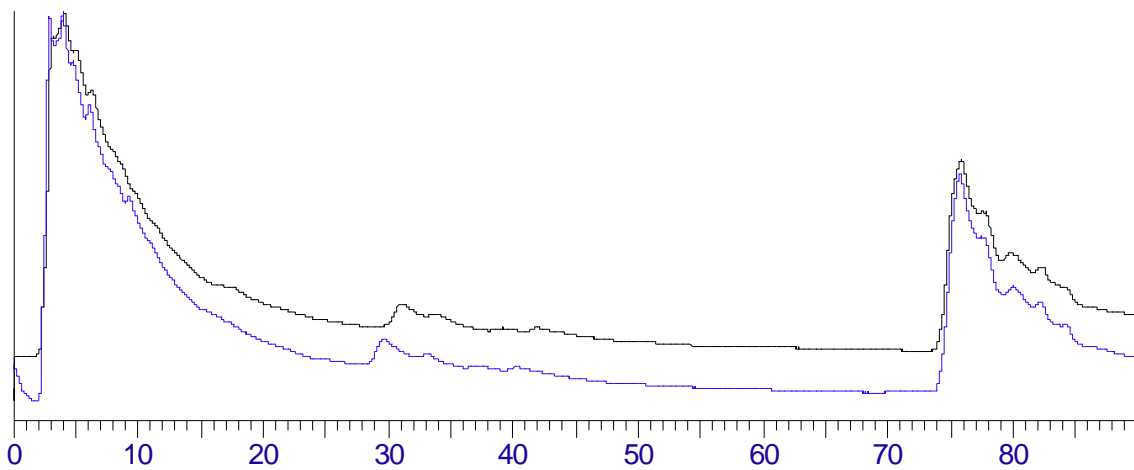


Figura 40. EXTRACTO ACETONICO DE CUATECOMATE

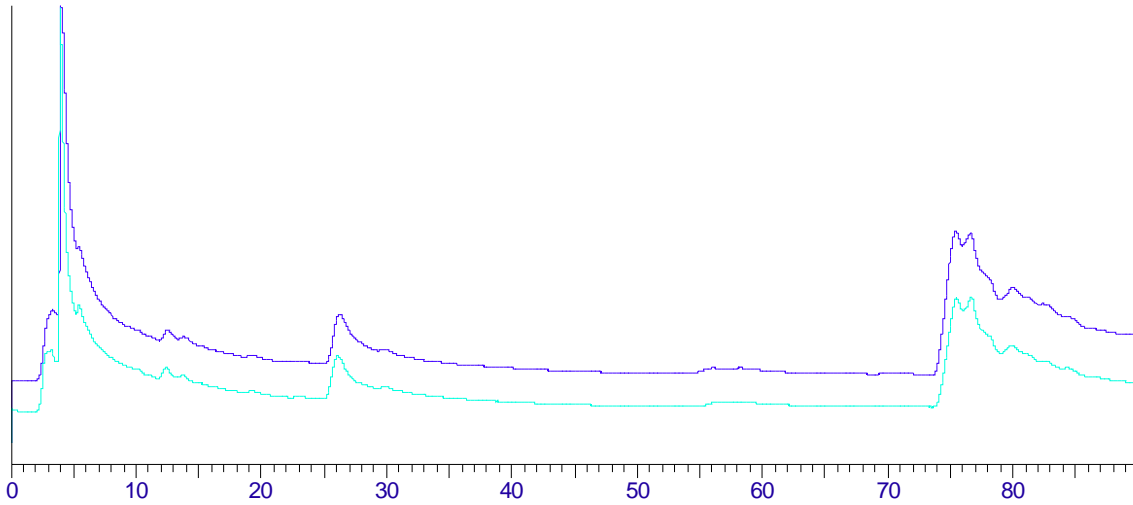


Figura 41. EXTRACTO ACETONICO DE GARAMBULLO

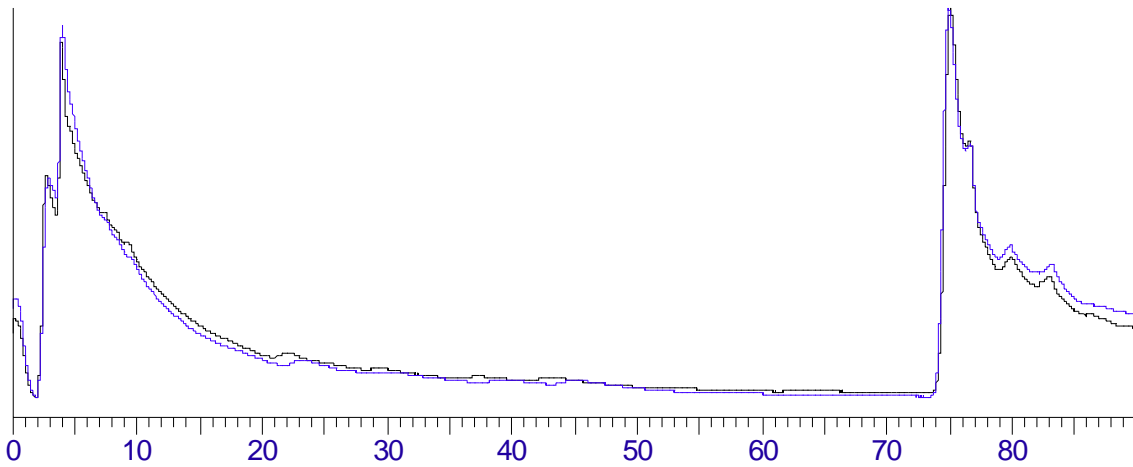


Figura 42. EXTRACTO ACETONICO DE MORA

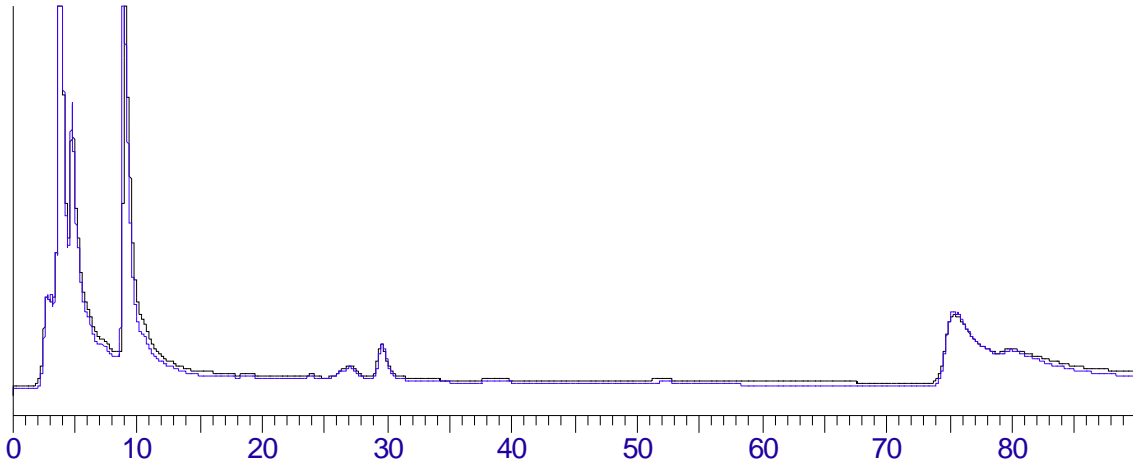


Figura 43. EXTRACTO ACETONICO DE PULPA DE CAFE

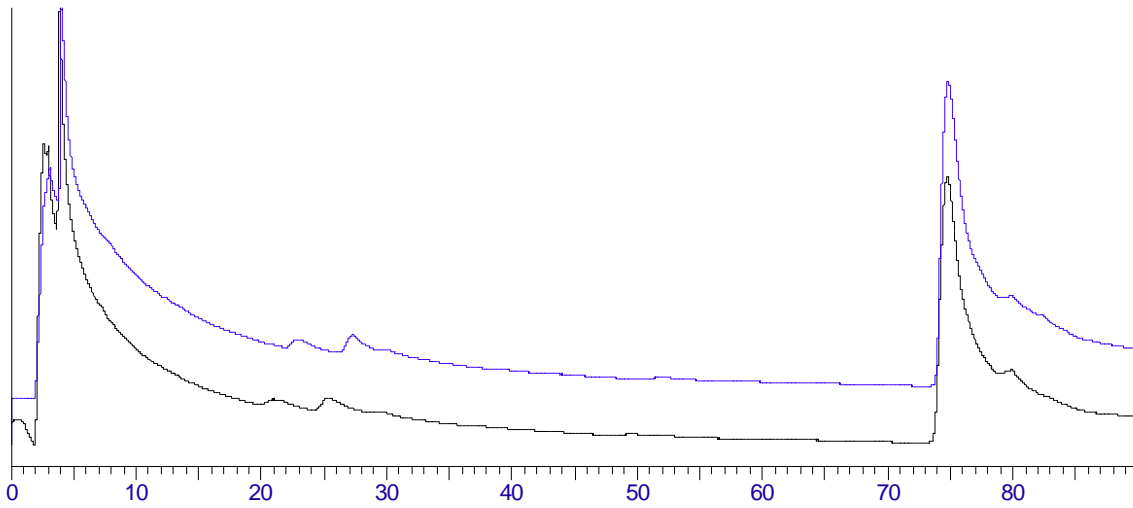


Figura 44. EXTRACTO ACETONICO DE CUTICULA DE UVA

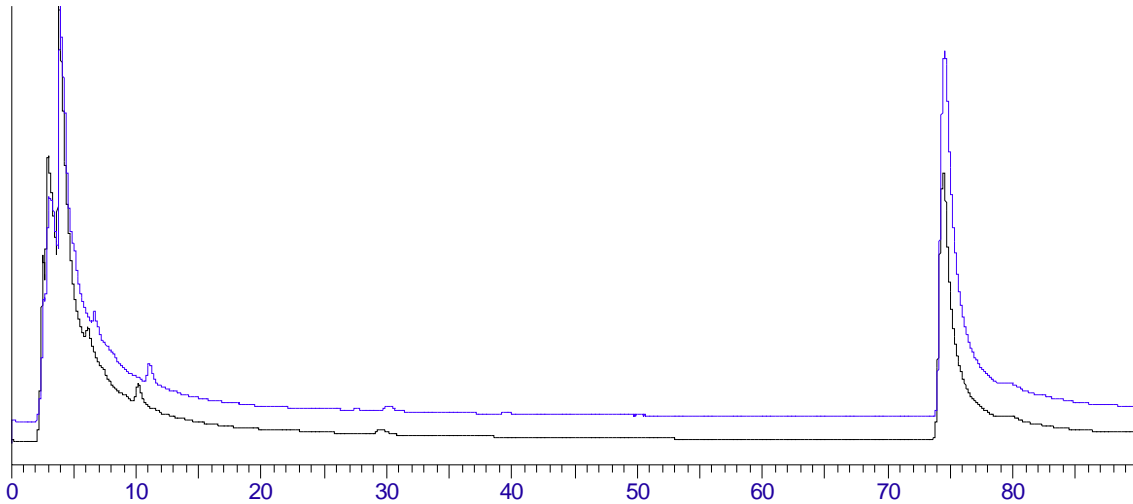


Figura 45. EXTRACTO ACETONICO DE SEMILLA DE UVA

CONCLUSIONES.

La mayoría de los extractos acetónicos obtenidos contenía un elevado índice de fenoles totales. La mayor concentración de taninos (como catequinas) se obtuvo en muestras de semilla de uva, cutícula de uva y pulpa de café.

Con excepción de los extractos de garambullo y la berenjena, los taninos obtenidos en el resto de las muestras analizadas fueron altamente sensibles a

los cambios de temperatura, pH y luz, Siendo este ultimo factor la fuente más importante de cambios en la estabilidad de estos compuestos.

El Análisis de HPLC demostró que la semilla de uva, cutícula de uva y mora son fuentes ricas de pelargonidina.

BIBLIOGRAFIA.

Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N. 2001. *"Análisis of condensed tannins: a review"*. Animal feed science and technology. 91: 21-40.

Galvano, F., La Fauci, L., Lazzarino, G., Fogliano, V., Ritieni, A., Galvano, G. 2004. *"Anthocyanins and cyanidins: chemistry, análisis, sources, and biological properties"*. Food science central.

Mateus, N., Proenca, S., Ribiero, P. 2001. *"Composición polifenolica de uvas y vino de variedades tintas de vitis vinifera en funcion de la altitud del viñedo"*. ALTAGA. 3: 102-110.

Dube, J.S., Reed, J.D., Ndlovu, L.R. 2001. *"Proanthocyanidins and other phenolics in acacia leaves of southern Africa"*. Animal feed science and technology. 91: 59-67.

Lopez, G. 1989. *"Taninos-aloe aceites esenciales"*. Universidad autónoma chapingo.

Moreno, Y., Bustos, F. 2003. *"Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados"*. Agrociencia. 37: 617-628.

Karakaya, S. 2001. *"Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds"*. International journal of food sciences and nutrition". 52: 501-508.

Souquet, J.M., Labarbe, B., Cheynier, V. 2000. "Phenolic composition of grape stems". American chemical society. 48: 1076-1080.

Sang, S., Lapsey, K., Jeong, W.S. 2002. "Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*prunus amygdalus batsch*)". American chemical society. 50: 2459-2463.

Meyer, A., Heinonen, M. 1998. "Antioxidant, interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation". Elsevier science. 6: 71-75.

Comesaña, R., Garcia, M., Lopez, M. 2001. "Bebidas enriquecidas con vitaminas antioxidantes: aspectos legales y estudio de su etiquetado nutricional". ALTAGA. 3: 173-179.

Makkar, H. 1999. "Quantification of tannins in tree foliage". Division of nuclear techniques in food and agriculture. Vienna, Austria.

Harvey, I. 2001. "Analysis of tannins hydrolysable". Animal feed science and technology. 91: 3-20.

Gil, M., Holcroft, D. 1997. "Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments". American chemical society. 45: 1662-1667.

Pavia, C., Scopa, A., Scranò, L. 2001. "Determination of phenolics compounds of biological interest in some Italian red wines by hplc-dad". American in food science. Volume 3.

Ho, P., Hogg, T.A. 1999. "Application of a liquid chromatographic method for the determination of phenolic compounds and furans in fortified wines". Food chemistry. 64: 115-122.

Choung, M., Baek, I., Kang. 2001. "Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*glycine max*)". American chemical society. 49: 5848-5851.

Häkkinen, S., Kärenlampi, S. 2000. "Ellagic acid content in berries". Eur food. 80

Ramirez, M.A., Marnet, N., Augur, C. 2002. "Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*coffea arabica*) by thiolysis-high-performance liquid chromatography". American chemical society. 52: 1334-1349.

Garibay, M., Quintero, R., Munguia, A. *“Biotecnología Alimentaria”*. Ed. Limusa. 2002. Mexico, DF.

Fox, B., Cameron, A. *“Ciencia de los alimentos, nutrición y salud”*. Ed. Limusa. 2002. Mexico, DF.

Tejeda, A., Montesinos, R.M., Guzman, R. *“Bioseparaciones”*. Ed. Unison. 1995. Hermosillo, Sonora.

Mozetic, B., Trebse, P. 2004. *“Changes of anthocyanins and hydroxycinnamic acids affecting the skin colour”*. Swiss society of food science and technology. 37: 123-128.

Porter, L., Hrstich, N. 1986. *“The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin”*. Pergamon press. 25: 223-230.

Zhu, Q., Holt, R., Lazarus, S. 2002. *“Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa”*. American chemical society. 50: 1700-1705.

<http://honeybee.helsinki.fi/MMSBL/Gerberalab/images/Fullpath.gif>

<http://www.hort.purdue.edu/hort/courses/HORT301/ANTHO/ANTH5.GIF>

http://www.consumer.es/web/es/nutricion/aprender_a_comer_bien/curiosidades/2004/04/27/99215.php

<http://www.aguamarket.com/Diccionario/terminos.asp?Id=2960>

http://www.iespana.es/natureduca/med_sustanc_taninos.htm

<http://148.233.168.204/pfnm/Taninos.html>

<http://www.plantasmedicinales.org/farmacognosia/feb2002/taninos.htm>