

Estudio del perfil de antocianinas en *Rubus Niveus* utilizando cromatografía líquida (HPLC) y pH diferencial

Miguel León Roperó
Beatriz Soledad

Universidad Católica Andrés Bello

Resumen

En este trabajo se presenta un estudio sobre el perfil de antocianinas que se encuentra en la frambuesa negra (*Rubus niveus*), una especie de origen asiático cuyo género (*Rubus*) pertenece a la familia de las Rosáceas. Para ello se emplearon las técnicas de Cromatografía Líquida de Alta Definición (HPLC) y de espectrofotometría UV-Vis de pH diferencial, con las cuales se identificaron y cuantificaron los pigmentos antocianínicos. De este modo se identificó la cianidina-3-rutinosido y se contabilizaron un total de antocianinas de 771,32 mg/L de extracto (17,09 mg/100 gr de peso fresco) en el fruto de la especie *Rubus niveus*.

Palabras clave: Antocianinas, *Rubus niveus*, HPLC, pH diferencial

Study of the profile of anthocyanin's in *Rubus niveus* using HPLC chromatography and pH differential

Abstract

In the present experimental investigation, a study was carried out on the anthocyanin's profile present in the black raspberry (*Rubus niveus*), a species of Asian origin whose genus (*Rubus*) belongs to the Rosaceae family. For this, the High Definition Liquid Chromatography (HPLC) and UV-Vis spectrophotometry techniques of the pH differential method were used, with which the anthocyanin pigments were identified and quantified. In this way, cyanidine-3-rutinoside was identified and a total of anthocyanin's of 771.32 mg / l of extract (17.09 mg / 100 gr fresh weights) were counted in the fruit of the species *Rubus niveus*.

Key words: Anthocyanin, *Rubus niveus*, HPLC, pH differential

1.INTRODUCCIÓN

Rubus niveus Thunb es una especie leñosa erecta y alta, que contiene una gran cantidad de espinas cuyos tallos son de corta longitud de vida. Las hojas son trifoliadas, la longitud de las flores mide alrededor de 1 cm de diámetro, con cinco pétalos de color rosa oscuro o rojo. Con la maduración el fruto va cambiando de color de rojo oscuro a negro y contiene una gran cantidad de semillas (Uniyal, Singh, Janwal, & Lal, 2006). Además, el fruto de *Rubus niveus* es un agregado de glóbulos subglobosos de drupas, midiendo alrededor de 1-2 cm de diámetro (Global Invasive Species Database (GISD), 2018)

En el reino vegetal, el género *Rubus* presenta una amplia diversidad. Sus frutos tienen altos contenidos de vitamina C, carotenos, antioxidantes y antocianinas. Por ende, son frecuentemente usadas para el consumo humano bien sea en frutos frescos o procesándose en mermeladas, jaleas, pasteles, productos lácteos y jugos. De igual forma, se emplean comúnmente para la elaboración de ciertas medicinas.

Rubus niveus es una especie presente mayoritariamente en zonas tropicales. Crece y se reproduce rápidamente, y se aclimata para resistir diversas condiciones ambientales. Su fruto maduro de color negro es frecuentemente consumido por nativos de la India y Nepal, debido a las propiedades anti inflamatorias, analgésicas, antipiréticas y anti Alzheimer. Estas características la convierten en un ingrediente fundamental para la medicina tradicional asiática. Además, es conocida como una especie de alto contenido en antocianinas.

En *Rubus niveus*, al igual que en otras especies, las antocianinas tienen una función expansiva ya que atraen a los polinizadores que dispersan a las semillas. De igual forma, tienen la capacidad de evitar la contaminación y las infecciones virales y microbianas en las mismas. En seres humanos, las antocianinas son conocidas por su alto poder antioxidante, por lo que, su consumo se ha visto relacionado con la baja incidencia de enfermedades coronarias, cáncer y diabetes, además de mejorar la agudeza visual y cognitiva. De igual forma, son usadas ampliamente en la confección de colores específicos en productos alimenticios y de consumo humano general (Garzón, 2008)

Las antocianinas, son compuestos pertenecientes al grupo de las sustancias fenólicas (aromáticas) más específicamente del grupo de los flavonoides. Ellas están presentes comúnmente en la naturaleza, dando pigmentaciones desde rojas intensas hasta azules a las flores, frutos, bayas y hojas con una amplia gama de estructuras químicas y concentraciones. De igual manera, se les considera como metabolitos secundarios de las plantas (sustancias naturales provenientes de los vegetales) con gran actividad biológica (Guerra & Ortega, 2006). Además, son sustancias hidrosolubles que se expanden ampliamente por el reino vegetal (Aguilera-Ortiz & Meza Velazquez, 2011).

Igualmente, estos pigmentos naturales se acumulan en las vacuolas de una amplia variedad de células y tejidos vegetales y en órganos reproductivos. Su producción biológica se lleva a cabo durante la síntesis de los isoflavonoides y flavonoles. Las enzimas encargadas de su biosíntesis, se encuentran en la parte citosólica del retículo endoplasmático liso, las cuales están organizadas en un complejo multienzimático conocido como “metabolon flavonoide”. De esta manera, las antocianinas recién sintetizadas, son llevadas desde el retículo endoplasmático liso hasta la vacuola celular por el MATE (extrusión de compuestos tóxicos y múltiples fármacos) y por ABC (casete de unión al ATP), que son transportadores de membrana y/o vesiculares. Se ha llegado a observar, que los tejidos de las raíces son las que contienen frecuentemente todas las enzimas necesarias para la biosíntesis de antocianinas (Landi, Tattini, & Gould, 2015).

Las antocianinas pueden ser identificadas y determinadas por técnicas de HPLC y por espectrofotometría UV-Vis (Nicoué, 2010). El método del pH diferencial es una técnica

espectrofotométrica ampliamente usada por tecnólogos de alimentos y horticultores, para la determinación del contenido de las antocianinas monoméricas totales. (Lee, Durst, & Wrolstad, 2005)

La espectrofotometría UV-Vis, es una técnica analítica que permite la cuantificación de numerosos compuestos. En 2001, Giusti y Wrolstad tomaron en consideración que las antocianinas son pigmentos muy propensos a sufrir transformaciones estructurales reversibles cuando hay cambios bruscos en el pH, y éstos se manifiestan con espectros de absorbancia muy diferentes entre sí, debido la predominancia del oxonio coloreado a pH 1,0 y a la forma hemiquetal incolora a pH 4,5. Fundamentados en este fenómeno los autores propusieron el método del pH diferencial utilizando valores de pH de 1,0 y de 4,5 para la cuantificación de antocianinas monoméricas totales, permitiendo una medición precisa y rápida de las antocianinas totales, incluso en presencia de pigmentos polimerizados y otros compuestos interferentes.

La cromatografía líquida de alta definición (HPLC) es una técnica analítica de separación frecuentemente utilizada debido a su alta sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para separar especies no volátiles y su gran aplicación en la industria, ciencia, ingeniería y sociedad en general, son algunas de las causas de la gran popularidad que posee esta técnica. Con ella, se pueden separar una gran cantidad de componentes como por ejemplo aminoácidos, proteínas, fármacos, terpenoides, antibióticos, especies órgano-metálicas, entre otras (Skoog, Holler, & Nieman, 2001). Ha sido muy utilizada en la caracterización estructural de los pigmentos antocianicos (Harborne & Grayer, 1988), por lo que es el procedimiento con mayor preferencia en el aislamiento e identificación de antocianinas. Las condiciones experimentales suelen ser en columnas en fase reversa, con mezclas de agua-metanol o acetonitrilo-metanol y con una detección de los componentes a 520 nm (Marcano & Hasegawa, 2002).

Existe una gran cantidad de investigaciones, como los de Salinas-Moreno, Almaguer-Vargas, Peña-Varela y Ríos Sánchez (2009) o Amanda, Santoni y Darwis (2015), que se han enfocado en dilucidar el perfil de antocianinas en frutos de especies como *R. rosifolius*, *R. occidentalis*, *R. idaeus*, entre otras. Sin embargo, los estudios más extensos y profundos acerca del contenido de antocianinas en el fruto de la especie *Rubus niveus* parecieran ser muy escasos, por lo que el perfil de antocianinas es poco conocido en la misma.

2.OBJETIVO

El estado actual del tema justifica plenamente el que el objetivo prioritario de la presente investigación sea caracterizar el perfil y contenido de antocianinas del fruto de la especie *Rubus niveus*.

3.METODOLOGÍA

La presente investigación ha sido de carácter experimental-descriptivo, ya que la muestra a trabajar se sometió a condiciones de laboratorio para obtener un resultado relacionado a los pigmentos antocianicos, que en este caso es la extracción de los mismos en el fruto de la especie *Rubus niveus*. La población a estudiar fue el fruto de la especie *Rubus niveus*, conocida como frambuesa negra. Esta planta fue certificada botánicamente como la mencionada especie por el Dr. Saúl Flores, jefe del Laboratorio de Suelos, Ambiente y Agricultura del Centro de Ecología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Las muestras del fruto se recogieron de diferentes plantas que están aisladas, es decir, sembrados dispersos pero que se encuentran en la misma zona residencial. Los mismos se localizan en el Municipio

Guaicaipuro, Los Teques, Estado Miranda, en una urbanización que está aproximadamente a 1200 metros sobre el nivel del mar (10°20'32.8"N 67°01'36.6"W).

Reactivos y soluciones

Los disolventes grado HPLC fueron el acetonitrilo (ACN) (Sigma-Aldrich, Alemania), el metanol pro análisis (Burdick y Jackson, USA) y el ácido fosfórico pro análisis de Fluka, Alemania. El ácido cítrico pro análisis fue de Merk, Alemania.

Materiales y equipos

Los materiales y equipos utilizados en este trabajo de investigación fueron para el análisis por espectrofotometría UV-Vis, un espectrofotómetro Thermo Scientific™ GENESYS 10S UV- Vis. Para el análisis por HPLC se empleó un equipo Dionex Ultimate 3000 LC (Germering Alemania), equipado con una bomba isocrática (ISO-3100SD), un compartimiento de columna (columna sobre TCC-3000) y un detector de longitud de onda variable Ultimate 3000 (VWD-3100), con sistema de inyección manual de 20 µL montado en una válvula de inyección (Rheodyne 8125, EE.UU). Columna de acero inoxidable analítica (5 micras de tamaño de partícula, 4 cm x 250 mm de diámetro) rellena con material de fase reversa C18 (Acclaim® 120). El sistema de control y adquisición de datos se llevó a cabo por el software Dionex LC (Chromleon Versión 6.80) y el programa Excel de Microsoft Office.

Recolección y traslado de la muestra

Los frutos fueron tomados al azar de diferentes plantas que estuviesen en los grados de maduración más avanzados. Para ello se tomó en cuenta el color violeta oscuro y la facilidad para sacarlo del pedúnculo, ya que estos elementos son signos de gran madurez en el fruto. Posteriormente, los frutos recolectados se depositaron en una bolsa y se mantuvieron en refrigeración a -10 °C.

Para el traslado, se preparó una cubeta de hielo en un envase TupperWare para refrigerar las muestras contenidas dentro de una bolsa, de modo que permanecieran congeladas durante el proceso. Luego, en el laboratorio, los frutos se mantuvieron dentro del congelador a una temperatura de -10 °C, hasta que se emplearon en el procedimiento experimental.

Extracción de antocianinas del fruto de la especie Rubus niveus Thunb con metanol acidificado.

Se preparó una solución de metanol al 95% y se acidificó con una solución de ácido cítrico 1 M hasta llegar a un pH 3,0. Esta solución tuvo un rol extractante de las antocianinas del fruto de la especie Rubus niveus. Luego, se pesó aproximadamente entre 3 y 4 gramos de fruto congelado y una vez descongelada la muestra, se trituró en un mortero mientras se le añadía la solución de metanol al 95% acidificado a pH 3,0, empleando un volumen igual a tres veces el peso de la muestra empleada (9-12 ml de extractante). Una vez finalizado el proceso, se observó el cambio de coloración a una tonalidad púrpura. Se transfirió el extracto a un beaker y se dejó macerar por 48 horas a temperatura ambiente.

Cumplido ese tiempo, se filtró la muestra al vacío y se obtuvo el extracto concentrado de antocianinas de un color púrpura bastante oscuro y brillante a la vez. Posteriormente se midió el pH y se ajustó a 3,0 con la solución de ácido cítrico 1 M empleada para acidificar el metanol.

Con la finalidad de asegurar que el extracto obtenido contenía antocianinas, se tomó 1 mL del extracto a pH 3,0 y se diluyó con 8 mL de agua destilada. Esto se hizo con la finalidad de que no se sobrepasara el rango espectrofotométrico cuando se fue a medir la λ máx. El resultado de esta dilución fue un cambio notable en la coloración púrpura, que tomó una tonalidad anaranjada más clara y brillante.

Se evaluó la λ máx del extracto concentrado ajustado a pH 3,0 y diluido ligeramente con agua destilada haciendo un barrido desde los 420 nm hasta los 720 nm para obtener el espectro de

absorbancia. Se encontró un valor de λ máx de 508 nm y al comparar este valor con el reportado en la literatura con relación al rango de absorbancia de las antocianinas ubicado entre los 500 nm y los 550 nm, se confirma la presencia de antocianinas en el extracto.

Espectrofotometría UV-VIS (pH diferencial)

Para llevar a cabo el procedimiento espectrofotométrico del pH diferencial siguiendo el procedimiento de Lee, Durst y Wrolstad (2005), primero se determinó el factor de dilución apropiado para la muestra al diluir con tampón de cloruro de potasio, pH 1,0 hasta que la absorbancia de la muestra λ Vis-max estuviera dentro de la pestaña lineal del espectrofotómetro. Para ello se dividió el volumen final de la muestra por el inicial.

Luego, se prepararon dos diluciones de la muestra, una con tampón de cloruro de potasio de pH 1,0 y la otra con tampón de acetato de sodio de pH 4,5, diluyendo cada una con el factor de dilución determinado previamente. Estas diluciones se dejaron reposar durante 15 minutos hasta que se equilibraran. De esta manera se pudo medir la absorbancia de cada dilución en λ Vis-max (determinada en el extracto puro y ajustado a pH 3,0 y diluido ligeramente con agua destilada) y a 700 nm (para corregir la turbidez), contra una celda en blanco llena de agua destilada.

Con los datos que se obtuvieron se pudo calcular la absorbancia diferencial entre ambas soluciones tamponadas. Los cálculos se realizaron de la siguiente manera según lo establecido por Lee, Durst y Wrolstad (2005):

$$\Delta\text{ABS} = (\text{ABS})_{\text{pH } 1,0} - (\text{ABS})_{\text{pH } 4,5}$$

$$\Delta\text{ABS} = (\text{ABS}_{\lambda\text{máx}} - \text{ABS}_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (\text{ABS}_{\lambda\text{máx}} - \text{ABS}_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5}$$

Con el valor de absorbancia que se obtuvo, se procedió a calcular la concentración total de antocianinas monoméricas en la muestra original usando la siguiente fórmula:

$$\text{Antocianina monomérica (mg/L)} = (\Delta\text{ABS} \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

Finalmente, se expresó el contenido de antocianinas totales como mg de cianidina-3-glucósido/100 gr de peso fresco utilizando la siguiente fórmula de acuerdo a lo indicado por García Pastor (2016):

$$\text{Antocianinas totales (mg/100 gr)} = \Delta\text{ABS} \times \text{PM} \times \text{Ve} \times \text{FD} \times 1000 / \epsilon \times l \times \text{Pm}$$

Donde FD= factor de dilución; PM= peso molecular de cianidina-3-glucósido (449,2 gr/mol); Ve= volumen de extracto empleado; ϵ = absortividad molar de cianidina-3-glucósido (26900); l= longitud de la celda espectrofotométrica (1 cm); Pm= peso de muestra empleada en la extracción y ΔABS = diferencial de absorbancia.

Cromatografía Líquida de Alta Definición (HPLC)

En primer lugar se preparó un sistema de disolventes (el eluyente) para la separación de antocianinas en Cromatografía Capa Fina (CCF). Se evaluaron dos sistemas de disolventes, uno empleando metanol 30% y el otro 4% ácido fosfórico/acetoneitrilo (9:1 v/v). Se seleccionó el eluyente que mejor realizara la separación de los compuestos presentes en el extracto mediante la CCF.

Una vez definido el sistema de disolventes, se pasó la muestra a través de un Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución marca Dionex, Ultimate 3000, provisto de una columna analítica de acero inoxidable de 4.0 x 250 mm rellena con material C-18 (Octadecilsilano químicamente enlazado a sílica porosa), cuya elución correspondiente se llevó de manera simultánea. Este proceso se realizó a una longitud de onda de 520 nm, puesto que es la longitud de onda específica de detección para las antocianinas en HPLC.

Finalmente, se registraron los cromatogramas y se realizó el análisis correspondiente para evaluar el perfil de antocianinas comparando los resultados obtenidos experimentalmente con cromatogramas provenientes de investigaciones que emplearon condiciones cromatográficas similares a las utilizadas en este trabajo.

El esquema general del procedimiento experimental para la determinación y cuantificación de antocianinas se presenta en la figura 1.

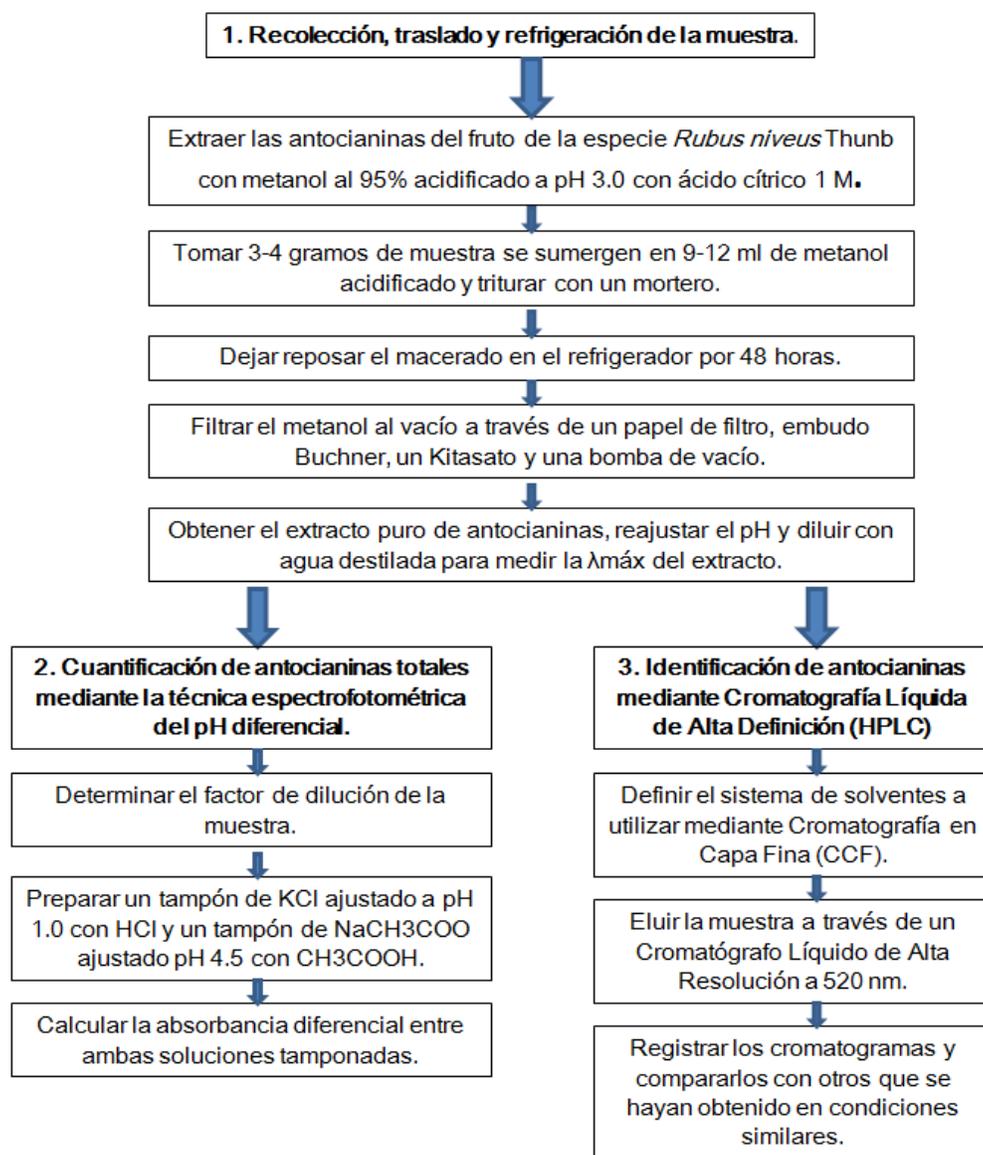


Figura 1. Esquema general del procedimiento experimental para la determinación y cuantificación de antocianinas

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Espectrofotometría UV-Vis (pH diferencial)

El espectro de absorbancia obtenido para determinar la longitud de onda máxima de absorción del extracto de antocianinas se efectuó entre los 420 y los 720 nm. En la figura 2 se presenta el espectro obtenido encontrándose un valor de longitud de onda máxima de 508 nm

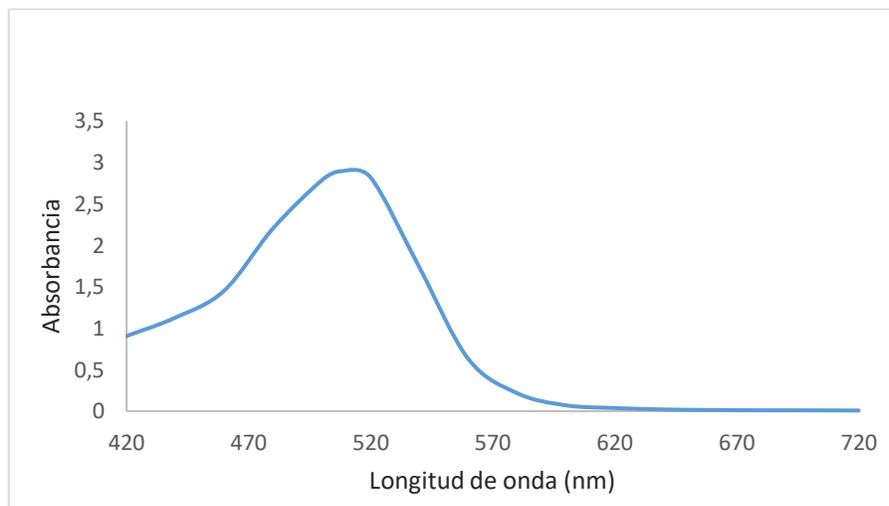


Figura 2. Espectro de absorción del extracto de antocianina obtenido con metanol acidificado con ácido cítrico 1 M (pH 3.0)

La λ máx determinada en el espectro de absorción fue de 508 nm y esta se utilizó para establecer las absorbancias con distintas disoluciones tamponadas a diferentes pH (KCl/HCl 0,025 M; pH 1,0 y CH₃COONa/CH₃COOH 0,4 M; pH 4,5). Posteriormente, para cada disolución tampón se determinó la absorbancia a 700 nm. Utilizando la ecuación (1), se calculó el diferencial de absorbancia. Este valor se introdujo en la ecuación (2) para obtener el contenido de antocianinas monoméricas y por último se calcularon las antocianinas totales como mg de cianidina-3-glucósido / 100 gr de peso fresco con la ecuación (3).

Los espectros de las muestras de antocianinas a pH 1,0 y pH 4,5 se muestran a continuación:

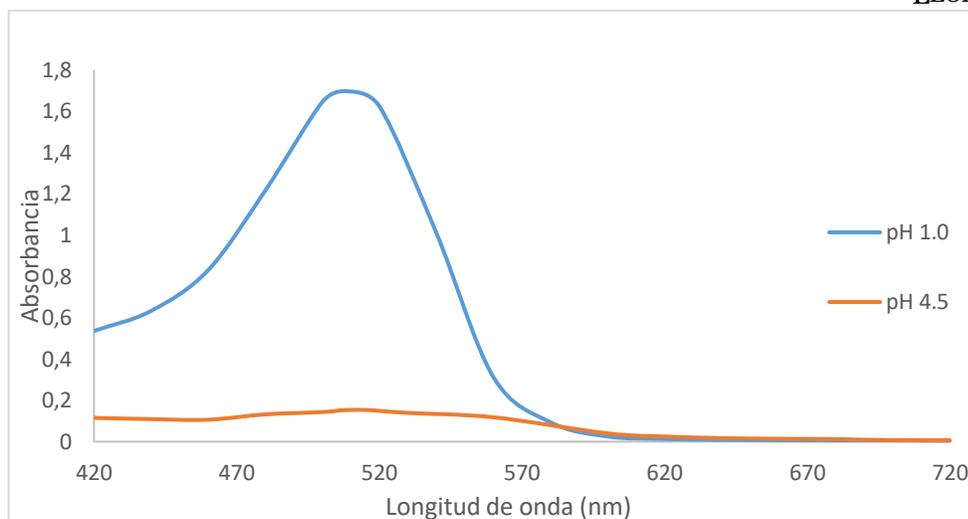


Figura 3. Espectro de Absorbancia de Antocianina a pH 1,0 y pH 4,5

Los resultados de la cuantificación de antocianinas se muestran en la tabla 1:

Tabla 1. Resultados de la cuantificación de antocianinas por medio del pH diferencial

ABS508nm; pH 1,0	ABS700nm; pH 1,0	ABS _{pH1.0}	ABS508nm; pH 4,5	ABS700nm; pH 4,5	ABS _{pH4.5}	ΔABS	Antocianinas Totales(mg/L)	Antocianinas Totales (mg/100 gr)
1,688	0,004	1,684	0,156	0,008	0,148	1,536	769,48	17,04
1,703	0,007	1,696	0,157	0,006	0,151	1,545	773,99	17,15
1,697	0,006	1,691	0,160	0,007	0,153	1,538	770,48	17,07
Promedio							771,32	17,09

Cromatografía Líquida de Alta Definición (HPLC)

Para evaluar el sistema de disolventes más adecuado para la separación de los diferentes compuestos presentes en el extracto y dado que el material de las láminas de Cromatografía en Capa Fina (CCF) son similares al material de la columna de HPLC (sílica gel), se llevó a cabo la evaluación de la separación de las antocianinas por CCF con los eluyentes metanol al 30% (MeOH 30%) y 4% ácido fosfórico/acetonitrilo (9:1 v/v) [4% H₃PO₄ /CH₃CN (9:1 v/v)], con la finalidad de encontrar un sistema de solventes que fuese capaz de separar el extracto de antocianinas.

En la figura 4 se observa la separación del extracto de antocianinas en las láminas de CCF, se escogió al metanol al 30 % por ser el sistema de solventes que dio la mejor separación.

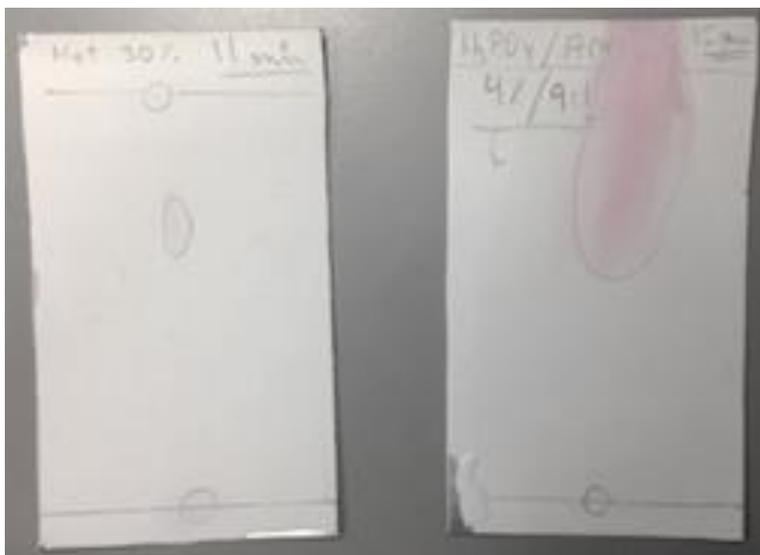


Figura 4. Corrida del extracto de antocianinas en CCF. MeOH 30% (izquierda) y [4% H₃PO₄ /CH₃CN (9:1 v/v)] (derecha)

Una vez determinado el sistema de disolventes más adecuado, se procedió a efectuar el estudio por HPLC. Para ello se utilizaron las siguientes condiciones cromatográficas: longitud de onda igual a 520 nm, temperatura de la columna igual a 30 °C, velocidad de flujo de 1 ml/min, tiempo de corrida de 30 minutos, volumen de inyección igual a 20 µL. En la figura 5 se presenta el cromatograma obtenido en la separación del extracto de antocianinas de *Rubus niveus*. Se encontró una sola antocianina con un tiempo de retención de 11,1 minutos. Al evaluar el cromatograma con el reportado por Căta, Ștefănuț, Pop, Tănăsie, Mosoarcă y Zamfir (2016), se observa que corresponde a la cianidina-3-rutinósido.

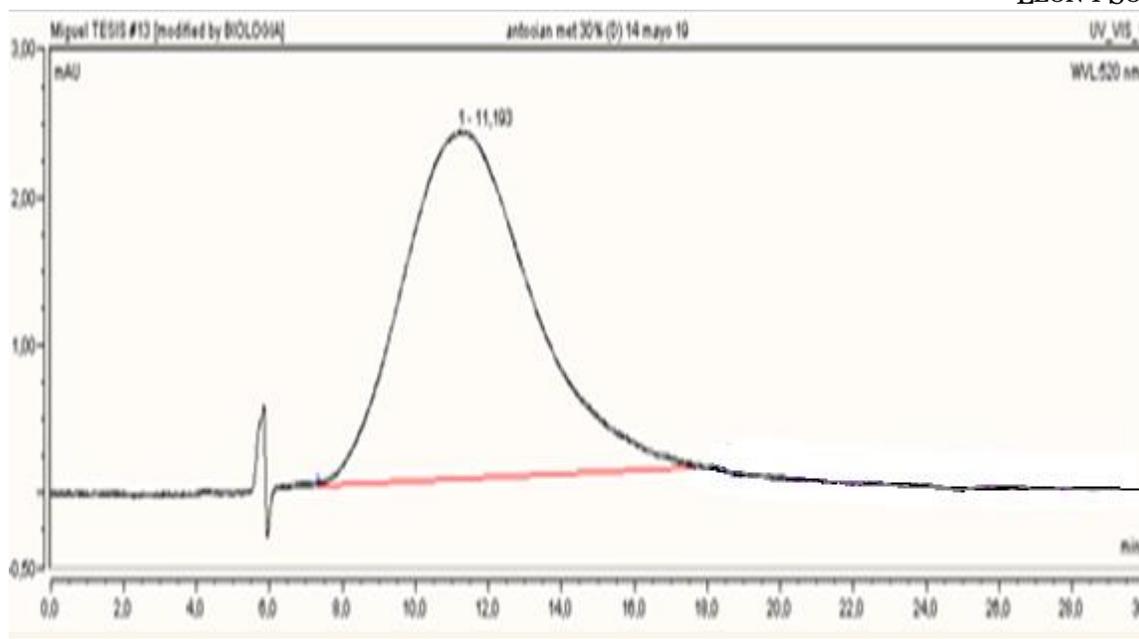


Figura 5. Cromatograma con el tiempo de retención de 11,1 minutos de la antocianina obtenida correspondiente a la Cianidina-3-rutinósido en *Rubus niveus*.

5. CONCLUSIONES

Se logró la extracción de antocianinas de la frambuesa negra (*Rubus niveus*) utilizando el procedimiento de extracción sólido-líquido con metanol acidificado con ácido cítrico 1 M, bajo las condiciones de temperatura de laboratorio (25-27°C), dando como resultado un contenido promedio de antocianinas totales en *Rubus niveus* Thunb de 771,32 mg/L que equivalen a 17,09 mg/100 gr de fruto.

El contenido de antocianinas totales obtenidas en *Rubus niveus* cuantificado por Espectrofotometría UV-Vis (pH diferencial) es mucho mayor que los reportados por Badhani y otros (2015) y Castilho Maro (2012), quienes reportaron concentraciones de antocianinas de 5,63 mg/100 gr y 3,32-1,89 mg/100 gr de peso fresco, respectivamente. Esto puede deberse a que estos frutos fueron cultivados en condiciones climáticas diferentes, distintas alturas, al tipo de siembra, y en el disolvente empleado para extraer el pigmento.

La antocianina identificada en *Rubus niveus* Thunb, bajo las condiciones cromatográficas empleadas en esta investigación, corresponde a la Cianidina-3-Rutinósido. Esta es la primera antocianina identificada hasta el momento en esta especie, ya que no se han reportado trabajos de investigación que hayan elaborado un perfil de antocianinas de la misma.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilera-Ortiz, M., & Meza Velazquez, J. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista BIOTecnia*, 8.

Amanda, H., Santoni, A., & Darwis, D. (2015). Extraction and simple characterization of anthocyanin compounds from *Rubus rosifolius* Sm fruit. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6.

Disponible en: <http://www.jocpr.com/articles/extraction-and-simple-characterization-of-anthocyanin-compounds-from-rubus-rosifolius-sm-fruit.pdf>

Badhani, Bhatt, Rawat, & Rawal. (2015). Variation in Chemical Constituents and Antioxidant Activity in Yellow Himalayan (*Rubus ellipticus*) and Hill Raspberry (*Rubus niveus*). *Journal of Food Biochemistry*, 11.

Castilho Maro, Pio, Santos Guedes, Patto de Abreu, & Nogueira Curi. (2012). Bioactive compounds, antioxidant activity and mineral composition of fruits of raspberry cultivars grown in subtropical areas in Brazil. *EDP Sciences*, 9.

Căta, A., Stefanut, M., Pop, R., Tanasie, C., Mosoarca, C., & Zamfir, A. (2016). Evaluation of Antioxidant Activities of Some Small Fruits Containing Anthocyanins Using Electrochemical and Chemical Methods. *Croatica Chemica*, 12.

García Pastor, M. (2016). Contenido en antocianos y compuestos fenólicos en diferentes frutos frescos y deshidratados. Trabajo fin de Máster Universidad Miguel Hernández de Elche, 65.

Garzón, A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Acto biol. Colomb.*, 36.

Giusti, M., & Wrolstad, E. (2001). Current Protocols in Food Analytical Chemistry. *Journal of Food and Agricultural Chemistry*, 13.

Global Invasive Species Database (GISD). (15 de Noviembre de 2018). Obtenido de <http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=1232>

Guerra, M., & Ortega, G. (2006). Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químico-físicos. Parte 1. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 11.

Harborne, J., & Grayer, R. (1988). *The Flavonoids*. Londres: Chapman and Hall Ltd.

Landi, M., Tattini, M., & Gould, K. (2015). Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. *Environmental and Experimental Botany*, 14.

Lee, J., Durst, R., & Wrolstad, R. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 10.

Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Caracas: Editorial Torino.

Nicoué Eugène, É. (2010). Identification des anthocyanes de deux espèces de bleuets sauvages du Québec "*Vaccinium angustifolium*" et "*Vaccinium myrtilloides*" et évaluation de leur potentiel antioxydant. Tesis Post-Doctoral, 187.

Salinas-Moreno, Almaguer-Vargas, Peña-Varela, & Ríos-Sánchez. (2009). Ácido elágico y perfil de antocianinas en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) con diferente grado de maduración. *Chapingo Serie Horticultura*, 5. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2009000100014

Skoog, Holler, & Nieman. (2001). *Principios de Análisis Instrumental*. Madrid: McGrawHill.