Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Química e Ingeniería Química
Escuela Profesional de Química

Evaluación del efecto de copigmentación de las antocianinas presentes en la cáscara de camu-camu en su estabilidad y protección al estrés oxidativo

TESIS

Para optar el Título Profesional de Química

AUTOR

María Victoria MUÑOZ AGUILAR

ASESOR

Dr. Julio César SANTIAGO CONTRERAS

Lima, Perú

2025



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Muñoz, M. (2025). *Evaluación del efecto de copigmentación de las antocianinas presentes en la cáscara de camu-camu en su estabilidad y protección al estrés oxidativo*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela Profesional de Química]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	María Victoria Muñoz Aguilar
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	72529902
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0004-4279-4387
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Dr. Julio César Santiago Contreras
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08505549
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-1905-7029
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Mg. Gloria Eva Tomas Chota
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07540332
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Dra. Melissa Rabanal Atalaya
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40876190
Datos de investigación	
Línea de investigación	Química Orgánica
Grupo de investigación	LIDQO
Agencia de financiamiento	ProCiencia contrato N°PE501078236-2022-PROCIENCIA
Ubicación geográfica de la investigación	Lima, Perú
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2022-2023
URL de disciplinas OCDE	Química orgánica https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.04.01

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central: 619 7000 anexos 1230 Telefax: 1209
Ciudad Universitaria – Calle Germán Amezaga 375 – Lima 1

ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los suscritos miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Química, bajo la Presidencia de la **Mg. Gloria Eva Tomas Chota** (Presidenta), la **Dra. Melissa Rabanal Atalaya** (Miembro) y el **Dr. Julio César Santiago Contreras** (Asesor), habiendo presentado para tal efecto la **TESIS,** titulada **"Evaluación del efecto de copigmentación de las antocianinas presentes en la cáscara de camu-camu en su estabilidad y protección al estrés oxidativo"** después de **SUSTENTADA Y APROBADA** la **TESIS** elaborado por la Bachiller en Química: **María Victoria Muñoz Aguilar;** para optar el **TÍTULO PROFESIONAL** de **QUÍMICA,** acordaron calificarla con la **NOTA** de:

Dieciseis ..... 16 .....

(LETRA) **(NÚMERO)**

Ciudad Universitaria, 21 de noviembre de 2025.

Mg. GLORIA EVA TOMAS CHOTA
PRESIDENTA

Dra. MELISSA RABANAL ATALAYA
MIEMBRO

Dr. JULIO CÉSAR SANTIAGO CONTRERAS
ASESOR

Dra. GLORIA ALEJANDRINA COSCO SALGUERO
Directora de la E.P. de Química

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, **Julio César Santiago Contreras** en mi condición de asesor acreditado con el Dictamen N° 00007-2025-EPQ-FQIQ/UNMSM de la tesis, cuyo título es **"Evaluación del efecto de copigmentación de las antocianinas presentes en la cáscara de camu-camu en su estabilidad y protección al estrés oxidativo"**, presentado por la bachiller **María Victoria Muñoz Aguilar** para optar el título profesional de QUÍMICA.

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el 09% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título correspondiente.

Lima, 12 de enero de 2026.

Firma del Asesor _____

Nombres y Apellidos del asesor: JULIO C. SANTIAGO C.

DNI 08505549

AGRADECIMIENTOS

A *ProCiencia,* por el financiamiento brindado (según Contrato N° PE501078236-2022-PROCIENCIA) para la ejecución de este proyecto, el cual permitió contar con los recursos necesarios para su desarrollo.

Al Dr. Julio Santiago, asesor de tesis, por su orientación académica y supervisión durante el trabajo realizado.

Asimismo, extiendo mi agradecimiento a los doctores Silvia Suárez y Augusto Pumacahua, por brindarme el acceso a los ambientes y espacios necesarios para complementar las actividades experimentales.

A Marlene Velásquez y Luis Salcedo, por su apoyo continuo a lo largo del proceso, contribuyendo al avance y ejecución de este estudio.

A todos ellos, gracias por su disposición y colaboración, que hicieron posible el desarrollo eficiente de esta investigación.

Finalmente, agradezco de manera especial a Giulliano Nájera, por su acompañamiento constante, su apoyo en momentos clave y su disposición para colaborar en distintas etapas de este proyecto. Su presencia, ánimo y compromiso no solo aportaron al progreso del estudio, sino también hicieron que este proceso fuera significativo.

ÍNDICE

RESUMEN 9
PALABRAS CLAVE 9
i INTRODUCCIÓN 10
i.1 Planteamiento del problema 10
i.2 Formulación del problema 10
i.3 Objetivos 11
i.4 Importancia y alcance de la investigación 11
i.5 Marco teórico 12
i.5.1 Enfermedad de Alzheimer 12
i.5.2 Camu camu 15
i.5.3 Productos naturales 18
i.5.4 Estabilidad de las antocianinas a factores ambientales 25
i.5.5 Copigmentación de antocianinas 27
i.5.6 Antioxidantes 35
Transferencia única de electrón vía transferencia de protón 36
Transferencia de un átomo de hidrógeno 37
Quelación de metales de transición 38
i.6 Antecedentes del estudio 41
i.7 Hipótesis 44
i.8 Variables 44
ii MATERIALES Y MÉTODOS 44
ii.1 Procedimientos 44
ii.1.1 Extracción de antocianinas de cáscara de camu-camu. 44
ii.1.2 Caracterización de antocianinas presentes en cáscara de camu-camu 45
ii.1.3 Copigmentación de antocianinas de cáscara de camu-camu 46
ii.1.4 Análisis termogravimétrico de ACC copigmentadas 49
ii.1.5 Análisis FT-IR de ACC copigmentadas 49
ii.1.6 Estabilidad de antocianinas copigmentadas a pH 7,4 y 37 °C 49
ii.1.7 Evaluación de estrés oxidativo *in vitro* por el método TBARS 50
ii.2 Análisis estadístico 51
iii RESULTADOS 51
iii.1 Extracción y caracterización de antocianinas de cáscara de camu-camu 51

iii.2 Copigmentación 53
iii.3 Espectros FTIR de antocianinas copigmentadas de cáscara de camu-camu 56
iii.4 Análisis termogravimétrico 61
iii.5 Estabilidad de antocianinas de cáscara de camu-camu a pH 7,4 y 37 °C 68
iii.6 Evaluación de estrés oxidativo *in vitro* 69
iv DISCUSIÓN DE RESULTADOS 70
iv.1 Extracción de antocianinas de camu-camu 70
iv.2 Copigmentación 71
iv.3 Espectros FTIR de antocianinas copigmentadas de cáscara de camu-camu 73
iv.4 Análisis termogravimétrico 74
iv.5 Estabilidad de antocianinas de cáscara de camu-camu a pH 7,4 y 37 °C 76
iv.6* Evaluación de estrés oxidativo *in vitro 76
v CONCLUSIONES 77
vi BIBLIOGRAFÍA 78

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Enfermedad de Alzheimer	EA
Especies reactivas de oxígeno	ROS
Especies reactivas de nitrógeno	RNS
Espectroscopía de masas por ionización electrospray	ESI-MS
Análisis termogravimétrico	TGA
Antocianinas de camu-camu	ACC
Ácido poliaspártico	AP
Ácido ferúlico	AF
Ácido cinámico	AC
Resveratrol	RE
Buffer fosfato salino	PBS
Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico	TBARS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efectos del estrés oxidativo en el cerebro: la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) induce peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y daño en el ADN, lo que conduce a daño neuronal. 14

Figura 2. Fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la EA. 15

Figura 3. Clasificación de las siete estructuras de flavonoides. 20

Figura 4. Clasificación de las seis estructuras principales de antocianinas. 21

Figura 5. Ejemplo de un espectro de masas y fragmentaciones de una antocianina. 25

Figura 6. Alteración en la estructura de las antocianinas inducida por el pH. 26

Figura 7. Ejemplos de espectros de absorción de soluciones de antocianinas copigmentadas ... 28

Figura 8. Formación de complejos entre antocianinas por autoasociación. 30

Figura 9. Formación de un complejo entre antocianina y copigmento ferúlico mediante un azúcar. 31

Figura 10. Formación de un complejo entre antocianina y copigmento ferúlico. 32

Figura 11. Formación de un complejo entre antocianina y antocianina mediante un metal (M^+). 33

Figura 12. Enlaces peptídicos α y β en la estructura del ácido poliaspártico (AP). 35

Figura 13. Mecanismo de quelación de metales por un antioxidante. 38

Figura 14. Mecanismo de peroxidación lipídica en lípidos insaturados inducida por ROS. 40

Figura 15. Reacción de formación del compuesto coloreado [MDA-$(TBA)_2$]. 41

Figura 16. Cromatograma del extracto de ACC. 53

Figura 17. Espectros UV-vis de ACC copigmentadas. 54

Figura 18. Espectros UV-vis de ACC doblemente copigmentadas. 56

Figura 19. Espectro FTIR de ACC, AP y AP16. 57

Figura 20. Espectros FTIR de ACC, AC, AC80 y ACP. 58

Figura 21. Espectros FTIR de ANT, AP, AF, AF80 y AFP. 60

Figura 22. Espectros FTIR de ACC, AP, RE, RE60 y ARP. 61

Figura 23. Termograma obtenido de ACC. 62

Figura 24. Termograma de ACC y AP16. 63

Figura 25. Termogramas de ANT, AC80 y ACP. 64

Figura 26. Termogramas de ANT, AF80 y AFP. 65

Figura 27. Termogramas de ANT, RE60 y ARP. 66

Figura 28. Antocianinas remanentes (AR %) de las ACC copigmentadas después de 24 h a condiciones fisiológicas (pH =7,4 y 37 °C) 68

Figura 29. Comparación de TBARS (nmol/g) de copigmentos, ACC y ACC copigmentadas. .. 70

Figura 30. Copigmentación de la antociana con el ácido poliaspartico. 72

Figura 31. Comparación entre las estructuras químicas del ácido ferúlico y el ácido cinámico. 72

Figura 32. Copigmentación de la antocianina con el resveratrol. 73

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estados de maduración y color de la cáscara de camu-camu. 17

Tabla 2. Clasificación taxonómica del camu camu..... 18

Tabla 3. Relaciones de masa de las antocianinas y los copigmentos fenólicos. 47

Tabla 4. Relaciones de masa de las antocianinas y el ácido poliaspártico..... 48

Tabla 5. Valores de AMT (en mg/100g) obtenidos en la optimización de la extracción. 52

Tabla 6. Fragmentos iónicos y tiempos de retención de antocianinas identificadas presentes en cáscaras de camu-camu..... 53

Tabla 7. Efectos hipercrómicos y batocrómicos de ACC copigmentadas con AP. 54

Tabla 8. Efectos hipercrómicos y batocrómicos de ACC copigmentadas con AC, AF y RE..... 55

Tabla 9. Efectos hipercrómicos y batocrómicos de ACC copigmentadas con AC, AF y RE..... 56

Tabla 10. Datos de estabilidad térmica de las ACC y ACC copigmentadas. 66

Tabla 11. Datos de estabilidad térmica de las ACC y ACC copigmentadas (continuación)..... 67

Tabla 12. Datos de estabilidad térmica de las ACC y ACC copigmentadas (continuación)..... 68

RESUMEN

En los últimos años se ha determinado un incremento alarmante de personas que sufren enfermedades la enfermedad de Alzheimer. Las personas que padecen la enfermedad de Alzheimer experimentan estrés oxidativo en el tejido cerebral, lo que conduce a la muerte neuronal. En este sentido, el desarrollo de nuevas alternativas que protejan el cerebro del estrés oxidativo sería de gran ayuda para el tratamiento de esta enfermedad. El camu-camu (*Myrciaria dubia)* es una especie vegetal cultivada ampliamente en Perú, cuyos extractos con altos contenidos de antocianinas poseen actividades antioxidantes prometedoras. La copigmentación mejora la estabilidad de las antocianinas, por ello, en este trabajo se copigmentaron antocianinas de cáscara de camu-camu con ácido poliaspártico, ácido cinámico, ácido ferúlico y resveratrol. La copigmentación óptima de las antocianinas de camu-camu (ACC) fue a una relación de masa 1:80 antocianina:copigmento con los copigmentos fenólicos. El mayor efecto hipercrómico se alcanzó con la muestra AP16 (25,09 %). El copigmento resveratrol (RE) en la muestra AR80 mostró la mejor protección de las antocianinas de camu-camu (ACC) —pérdida de masa por degradación de antocianinas de solo 18,53 % y Tmax de 193,33 °C —. Las muestras copigmentadas presentaron entre 51,55 % y 56,57 % de antocianinas remanentes a condiciones fisiológicas después de 24 h, mayor en comparación a las antocianinas sin copigmentar (45,61 % de antocianinas remanentes). La copigmentación con resveratrol (RE) resultó en los menores valores de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (44,43 nmol/g) en comparación a los demás copigmentos usados.

PALABRAS CLAVE

Antocianinas, camu-camu , copigmentación, enfermedad de Alzheimer, estrés oxidativo.

i INTRODUCCIÓN

i.1 Planteamiento del problema

En los últimos años, se ha observado un aumento preocupante en la cantidad de personas afectadas por la enfermedad de Alzheimer (EA) y se estima que 139 millones de personas padecerán de esta enfermedad en el año 2050 (1). La EA puede ser causada por exceso de estrés oxidativo en el cerebro, lo que eventualmente causa deterioro cognitivo (2). Por ello, el desarrollo de nuevos tratamientos que inhiban el estrés oxidativo podría ser una alternativa para el tratamiento de la EA. Las antocianinas son metabolitos secundarios que han demostrado ser prometedoras para el tratamiento de la EA y presentan una buena capacidad de inhibir el estrés oxidativo (3); sin embargo, estas son sensibles a la degradación a pH mayor que 3 y a temperaturas cercanas a 40 °C (4). Por ello, es necesario recurrir a técnicas para estabilizar las antocianinas en condiciones fisiológicas (pH 7,4 y 37 °C) si es que se quiere utilizarlas para el tratamiento de la EA.

Con este contexto, esta tesis tiene como objetivo analizar cómo la copigmentación con ácido poliaspártico, ácido cinámico, ácido ferúlico y resveratrol puede influir en la estabilidad y la capacidad protectora de las antocianinas extraídas de cáscara de camu-camu frente al estrés oxidativo en tejido cerebral.

i.2 Formulación del problema

¿Cómo afectará la copigmentación de las antocianinas de cáscara de camu-camu en su estabilidad y protección al estrés oxidativo?

i.3 Objetivos

Objetivo general

Evaluar del efecto de copigmentación de las antocianinas presentes en la cáscara de camu-camu en su estabilidad y la protección al estrés oxidativo.

Objetivos específicos

1. Evaluar las condiciones óptimas de copigmentación del extracto de antocianinas de cáscara de camu -camu con los copigmentos ácido ferúlico, ácido cinámico, resveratrol y ácido poliaspártico.
2. Evaluar el efecto de la copigmentación en la estabilidad y protección al estrés oxidativo de las antocianinas de la cáscara de camu-camu.

i.4 Importancia y alcance de la investigación

Actualmente, la EA carece de una cura definitiva, y las terapias disponibles se enfocan principalmente en ralentizar los síntomas. Por ello, desarrollar extractos de antocianinas con mayor estabilidad y potencialmente mejor actividad inhibitoria contra el estrés oxidativo podría representar una mejora en el tratamiento de esta enfermedad, especialmente en adultos mayores.

Además, el aprovechamiento de las cáscaras, las cuales son desechos agroindustriales, como fuente de antocianinas no solo permitiría mejorar el tratamiento, sino que también añadiría un valor económico al camu-camu. Esto podría incentivar un aumento en la producción y consumo de camu-camu a nivel nacional, promoviendo su valorización como un recurso con aplicaciones tanto en la salud como en la sostenibilidad agrícola.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

i.5 Marco teórico

i.5.1 Enfermedad de Alzheimer

La EA es una enfermedad neurodegenerativa que afecta principalmente a personas mayores de 65 años y se caracteriza por la pérdida de memoria y cambios en el comportamiento. Se cree que la EA surge debido a la acumulación anormal de placas de β-amiloide y ovillos neurofibrilares de proteína tau en el cerebro, lo que provoca neurodegeneración. Actualmente no existe cura para la EA y los fármacos aprobados para su tratamiento solo funcionan como ralentizadoras de sus síntomas. En años recientes se ha descubierto que diversas hipótesis, como estrés oxidativo o inflamación en el cerebro, también podrían ser claves en el desarrollo de la EA (5).

i.5.1.1 Hipótesis del origen de la enfermedad de Alzheimer

Existen diversas hipótesis para explicar cómo se desarrolla la EA en el cerebro. Las dos hipótesis más estudiadas son la "hipótesis de la cascada amiloide" y la "hipótesis de tau".

Con el paso de los años se ha descubierto que más factores contribuyen al origen y agravamiento de los síntomas de la EA, destacando la “hipótesis del estrés oxidativo”.

Hipótesis de la cascada amiloide

Esta hipótesis postula que la acumulación de proteína β-amiloide (Aβ) en el cerebro es uno de los principales eventos que desencadenan la EA. Esta proteína se origina a partir del procesamiento anómalo de la proteína precursora de amiloide (APP) por las enzimas β-secretasa y γ-secretasa, lo que genera péptidos β-amiloide de diferentes longitudes, especialmente el Aβ42, que es altamente propenso a la agregación. Estos péptidos se agrupan formando oligómeros tóxicos y, posteriormente, placas extracelulares insolubles que

ocasionan toxicidad y muerte neuronal (5).

Hipótesis de tau

En condiciones normales, la proteína tau estabiliza los microtúbulos, estructuras esenciales para la estabilidad de las neuronas. La hipótesis de tau postula que, en condiciones de la EA, la proteína tau sufre una fosforilación excesiva debido a la desregulación de quinasas como GSK-3β y CDK5, lo que reduce su afinidad por los microtúbulos y provoca su desensamblaje. Esto genera la acumulación de tau hiperfosforilada en forma de ovillos neurofibrilares dentro de las neuronas, interfiriendo con el transporte axonal y ocasionando neurodegeneración (5).

Hipótesis del estrés oxidativo

La hipótesis del estrés oxidativo en la EA propone que el daño celular causado por especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) desempeña un papel fundamental en el desarrollo y progresión de esta enfermedad neurodegenerativa. Un desequilibrio entre la producción de ROS y RNS y la capacidad antioxidante de las células neuronales conduce a la oxidación de lípidos, proteínas y ADN, lo que resulta en disfunción y muerte neuronal (Figura 1). En la EA, se ha observado que la sobreproducción de ROS y RNS en el cerebro puede promover la hiperfosforilación de tau y acumulación de proteína β-amiloide, agravando los síntomas de esta enfermedad. Este proceso contribuiría a la pérdida de sinapsis, la disfunción mitocondrial y la neurodegeneración. Por ello, esta hipótesis sugiere que reducir el estrés oxidativo podría ser una estrategia terapéutica prometedora para retrasar o prevenir la progresión de la EA (6,7).

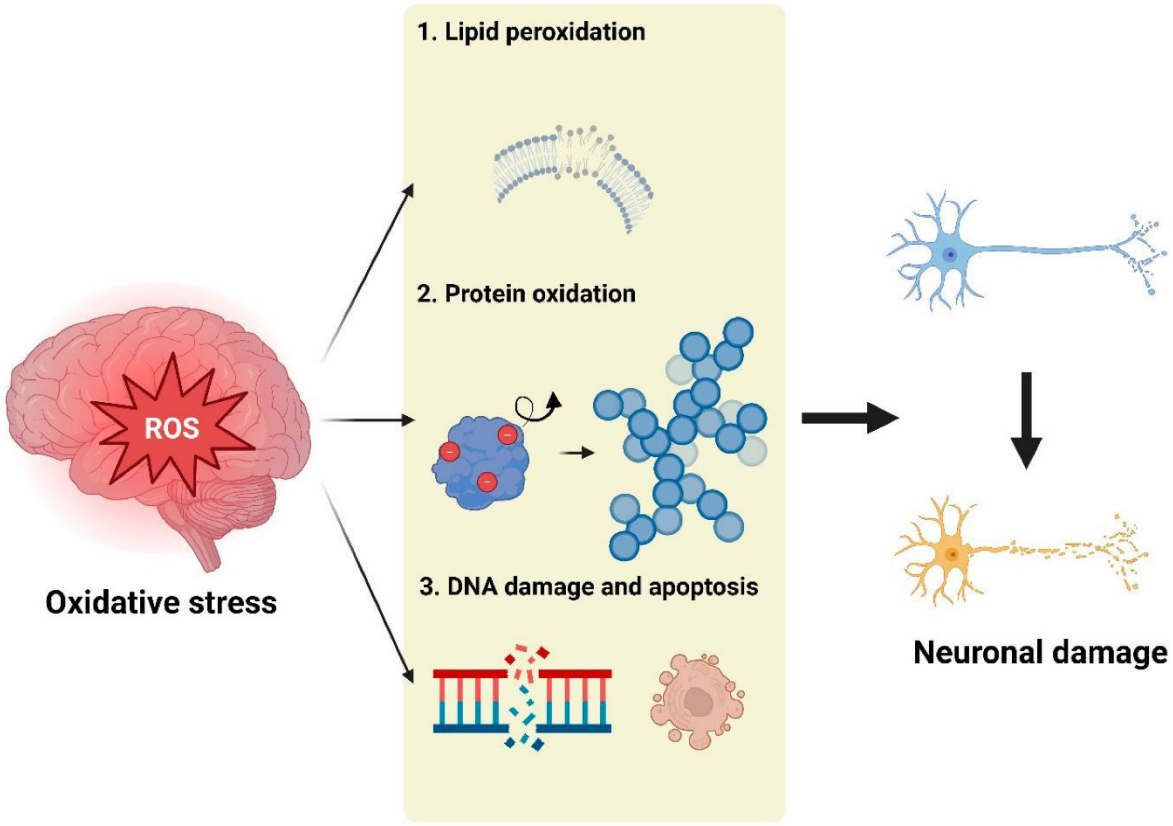


Figura 1. Efectos del estrés oxidativo en el cerebro: la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) induce peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y daño en el ADN, lo que conduce a daño neuronal.

Fuente: Obtenido de (7)

i.5.1.2 Epidemiología de la EA

La EA es la causa más común de demencia a nivel mundial, representando entre el 60 % y 70 % de los casos. Su prevalencia aumenta significativamente con la edad, afectando aproximadamente al 5-10 % de las personas mayores de 65 años y hasta al 50 % de aquellos mayores de 85 años. Se estima que más de 50 millones de personas padecen de la EA en el mundo, y se proyecta que esta cifra se triplique para 2050. La enfermedad es más frecuente en mujeres que en hombres, en parte porque las mujeres tienden a vivir más años. Factores de

riesgo como la edad, la genética, la diabetes, la hipertensión y el estilo de vida sedentario contribuyen a su desarrollo. Además, existen diferencias geográficas y socioeconómicas en su distribución, presentándose un mayor número de casos en países de ingresos bajos y medios, donde el acceso a diagnósticos y tratamientos es limitado. Por ejemplo, se estima que más de 200 mil personas mayores de 60 años sufren de la EA en el Perú (8).

i.5.1.3 Tratamiento de la EA

El tratamiento de la EA se centra en manejar los síntomas, retrasar la progresión de la enfermedad y mejorar la calidad de vida de los pacientes, ya que actualmente no existe una cura. Entre los fármacos aprobados por la Food Drug Administration están los inhibidores de la colinesterasa: donepezilo, rivastigmina y galantamina (Figura 2), que aumentan los niveles de acetilcolina en el cerebro, mejorando temporalmente la cognición y el funcionamiento diario en etapas leves a moderadas. Para casos moderados a severos, se emplea la memantina, un modulador del glutamato que ayuda a regular la actividad neuronal. Además, se aprobaron recientemente fármacos dirigidos a las proteínas Aβ y tau, los cuales son los anticuerpos monoclonales aducanumab y lecanemab (9).

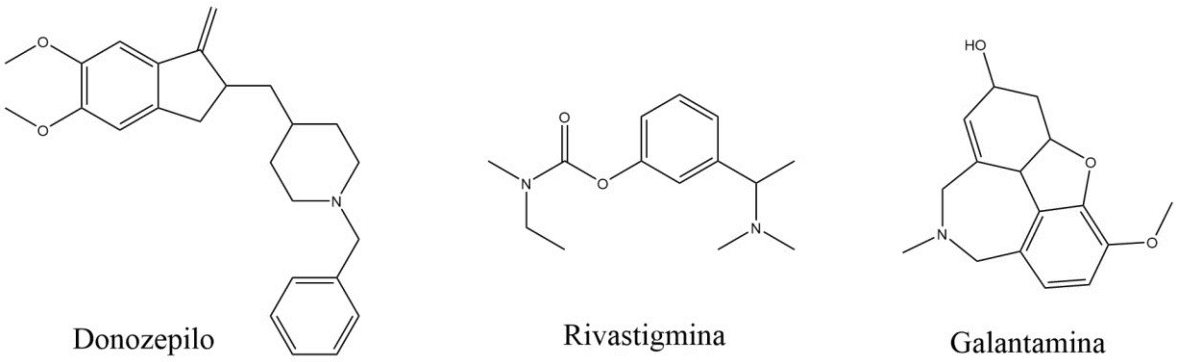


Figura 2. Fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la EA.

i.5.2 Camu-camu

El camu-camu (*Myrciaria dubia*) es un arbusto frutal nativo de la Amazonía, conocido por su

alto contenido de vitamina C, que puede alcanzar hasta más de 3000 mg por 100 g de pulpa. Es una especie en proceso de domesticación y tiene un gran potencial económico debido a su valor nutricional y su uso en la industria alimentaria y cosmética. Se encuentra principalmente en la Amazonía peruana y brasileña, aunque también hay poblaciones en Colombia y Venezuela. En Perú, su cultivo es abundante en el departamento de Loreto, Ucayali y San Martín (10). El camu-camu presenta 4 estados de maduración diferenciados: verde, pintón, maduro y sobremaduro (Tabla 1). El color rojizo del camu-camu se va intensificando a lo largo del proceso de maduración, pasando de un 0-25 % de coloración rojiza en el estado verde, a 75-100 % de coloración rojiza cuando está maduro (11). Este cambio de coloración se debe al aumento de fenoles en la cáscara del camu-camu en el proceso de maduración, especialmente por su contenido de antocianinas, el cual es un pigmento rojizo natural (12) .

T>abla 1. Estados de maduración y color de la cáscara de camu-camu.

Fruto	Estado de maduración	Color de cáscara
	Verde	0-25 % pigmentación rojiza
	Pintón	26 – 50 % pigmentación rojiza
	Maduro	75 – 100 % pigmentación rojiza
	Sobremaduro	100 % pigmentación rojiza

Fuente: Obtenido de (11)

i.5.2.1 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica del camu-camu se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación taxonómica del camu-camu.

Tipo	Fanerógamas
Subtipo	Angiosperma
Clase	Dicotiledóneas
Orden	Myrtales
Familia	*Myrtaceae*
Género	*Myrciaria*
Especie	*Dubia*
Nombre común	Camu-camu

Fuente: Obtenido de (10)

i.5.3 Productos naturales

Los productos naturales son compuestos químicos o mezclas de compuestos que se originan a partir de organismos vivos, como plantas, microorganismos y animales. Estos compuestos suelen tener estructuras complejas y funciones biológicas diversas, desempeñando roles esenciales en la defensa, la comunicación y el metabolismo de los organismos que los producen. Se han utilizado históricamente en la medicina tradicional y moderna, ya que muchas moléculas bioactivas derivadas de productos naturales han servido como base para el desarrollo de fármacos. Su obtención puede realizarse mediante extracción directa de fuentes naturales, síntesis química o biotecnología. Además, su estudio es de gran interés en la química, la farmacología y la biotecnología, dado su potencial terapéutico y su diversidad estructural (13).

Metabolitos primarios

Los metabolitos primarios son compuestos esenciales para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de los organismos, ya que participan en procesos metabólicos fundamentales como la respiración, la fotosíntesis y la síntesis de macromoléculas. Por ello, se dice que los metabolitos primarios son esenciales para la vida celular. Estos metabolitos se clasifican en cuatro grupos principales (13):

- Carbohidratos: proporcionan energía y estructura celular
- Lípidos: actúan como reserva energética y forman membranas celulares
- Proteínas: desempeñan funciones estructurales y enzimáticas
- Ácidos nucleicos: almacenan y transmiten la información genética.

Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento o la reproducción de los seres vivos, pero desempeñan funciones clave en la interacción con su entorno. Estos compuestos suelen estar involucrados en la defensa contra depredadores, la resistencia a patógenos, la comunicación química y la adaptación al medio. Se clasifican en tres grupos principales: alcaloides, terpenoides y fenoles (13).

Los fenoles son la clase de metabolitos secundarios más común y se caracterizan por la presencia de uno o más grupos hidroxilo (-OH) unidos a un anillo aromático. Se clasifican en varios grupos según su estructura y complejidad, incluyendo taninos, ácidos fenólicos y flavonoides (14).

i.5.3.1 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de compuestos fenólicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, caracterizados por una estructura básica de 15 carbonos compuesta por dos anillos

aromáticos (A y B) unidos por un puente de tres carbonos que generalmente forma un anillo piránico (C). Su diversidad estructural se debe a la variación en la oxidación y sustitución del anillo C, lo que permite clasificarlos en 7 diferentes subgrupos: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, isoflavonas y antocianinas (Figura 3). Estas variaciones estructurales influyen en sus propiedades fisicoquímicas y biológicas, como su capacidad antioxidante y su interacción con biomoléculas. Los flavonoides desempeñan diversas funciones en las plantas, incluyendo la protección contra la radiación UV, la defensa frente a herbívoros y patógenos, y la atracción de polinizadores mediante la coloración de flores y frutos. En los seres humanos, han sido ampliamente estudiados por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y su potencial efecto protector contra enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (15).

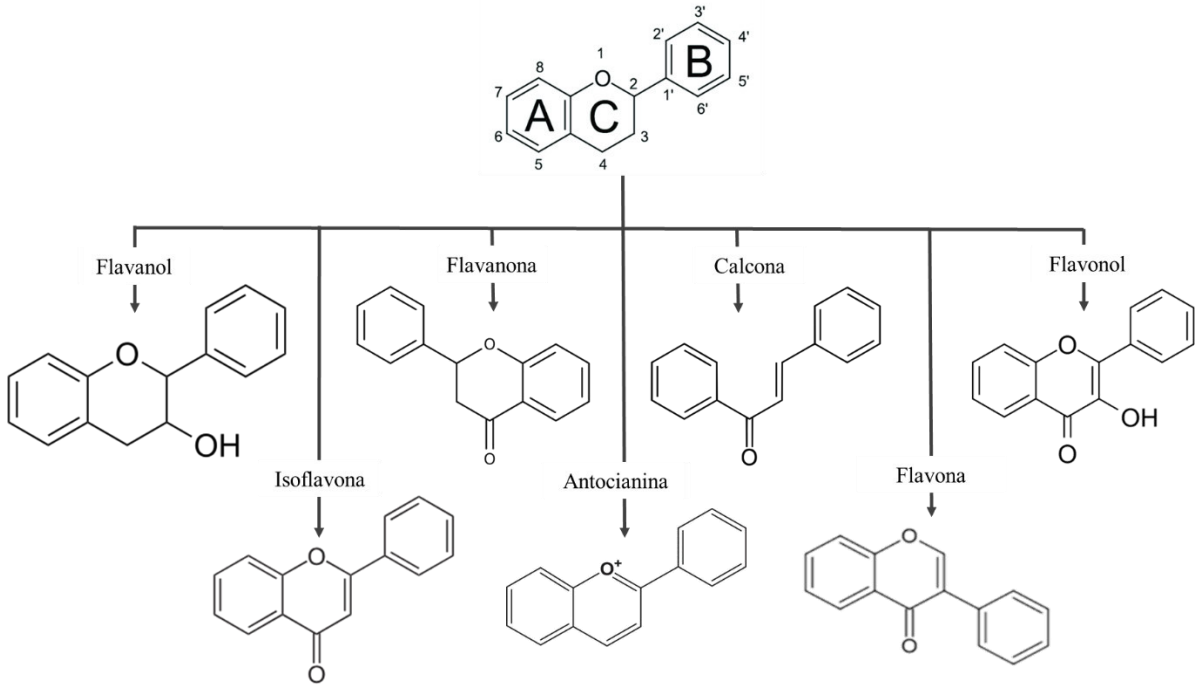
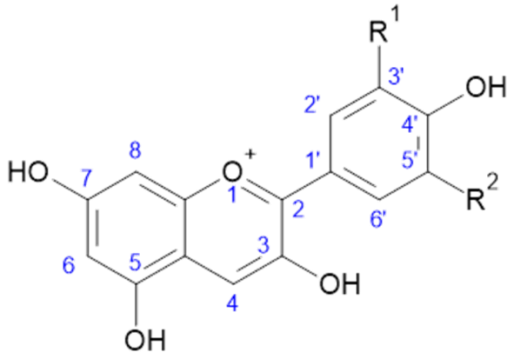


Figura 3. Clasificación de las siete estructuras de flavonoides.

i.5.3.2 Antocianinas

Las antocianinas son pigmentos flavonoides hidrosolubles que pertenecen a la familia de los compuestos fenólicos y son responsables de la amplia gama de colores rojos, azules, morados y púrpuras en frutas, flores, hojas y otros tejidos vegetales. Estructuralmente, las antocianinas están compuestas por un núcleo central llamado antocianidina, que es un catión flavilio (2-fenilbenzopirilio), y están unidas a uno o más azúcares mediante enlaces glucosídicos, formando así los glicósidos de antocianidinas (conocidos también como antocianinas). Las antocianidinas se clasifican según el número y la posición de los grupos hidroxilo (-OH) y metoxilo (-OCH_3) en su estructura, siendo las principales antocianidinas: cianidina, delfinidina, pelargonidina, peonidina, petunidina y malvidina (Figura 4) (16).



Antocianina	R^1	R^2
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH_3	H
Petunidina	OCH_3	OH
Malvidina	OCH_3	OCH_3

Figura 4. Clasificación de las seis estructuras principales de antocianinas.

La glicosilación es un proceso clave en la formación de las antocianinas, donde los azúcares

se unen a las antocianidinas en posiciones específicas. La glicosilación en la posición C3 del anillo C es la más frecuente, pero también se observa en otras posiciones como C5 y C7 del anillo A. Las glicosilaciones más comunes involucran monosacáridos como la glucosa, galactosa, ramnosa y arabinosa, aunque también pueden encontrarse disacáridos como la rutinosa (glucosa-ramnosa) o la soforosa (glucosa-glucosa). Además, las antocianinas pueden sufrir acilación, donde un ácido orgánico (como el ácido cafeico, ferúlico o málico) se une a los azúcares, lo que aumenta su estabilidad y modifica sus propiedades fisicoquímicas.

En cuanto a su biosíntesis, las antocianinas se producen a través de la ruta de los fenilpropanoides, donde la fenilalanina es convertida en ácido cinámico y luego en chalconas, que son precursoras de los flavonoides. La enzima clave en esta ruta es la chalcona sintasa, que cataliza la formación de la chalcona a partir de malonil-CoA y p-cumaril-CoA. Posteriormente, las chalconas son convertidas en flavanonas, dihidroflavonoles y finalmente en antocianidinas, que son glicosiladas para formar antocianinas. Actualmente, se conocen hasta 30 tipos de antocianidinas diferentes y más de 700 tipos de antocianinas (16).

i.5.3.3 Métodos de extracción, purificación y cuantificación de antocianinas

La extracción con solventes (extracción sólido-líquido) es la más utilizada y consiste en la solubilización de las antocianinas en solventes polares, como agua, etanol, metanol o acetona, que, con ayuda de calentamiento, son capaces de romper las paredes celulares y liberar los pigmentos. El etanol es preferido en aplicaciones alimentarias debido a su baja toxicidad, mientras que el metanol es más eficiente pero menos seguro. La extracción se realiza generalmente a temperatura ambiente o con calentamiento moderado (40-60 °C) para evitar la degradación térmica de las antocianinas. El pH del solvente de extracción también es crítico, ya que las antocianinas son más estables en medios ácidos (pH 1-3) y se espera una extracción

más eficiente a esas condiciones (17).

La cuantificación de antocianinas puede realizarse por cromatografía líquida (HPLC), sin embargo, este método es costoso y poco eficiente para la cuantificación de antocianinas en extractos complejos de origen vegetal. Otra alternativa más económica es el empleo de la metodología propuesta por la AOAC en el año 2005, denominada como el método de pH diferencial (18). Este método se fundamenta en la capacidad de las antocianinas de existir en diferentes formas estructurales dependiendo del pH del medio: a pH ácido (pH 1.0), las antocianinas predominan en su forma catión flavilio (forma coloreada), mientras que a pH más alto (pH 4,5), se convierten en su forma incolora (base quinoidal o carbinol). Luego, se mide la absorbancia de ambas soluciones a una longitud de onda específica, la cual dependerá de la naturaleza de la estructura de las antocianinas presentes en la muestra a analizar. La diferencia de absorbancia entre las dos soluciones (a pH 1,0 y pH 4,5) es proporcional a la concentración de antocianinas en la muestra. Este método es altamente específico para antocianinas, ya que otros compuestos fenólicos no muestran cambios significativos en su absorbancia con el pH.

El procedimiento consiste en preparar dos soluciones de la misma muestra: una se ajusta a un pH ácido (pH 1,0, usando un buffer de cloruro de potasio) y la otra a un pH más alto (pH 4,5, usando un buffer de acetato de sodio). Luego, se mide la absorbancia de ambas soluciones a una longitud de onda específica, generalmente entre 510 y 540 nm, que corresponde al máximo de absorción de las antocianinas en su forma catión flavilio. La diferencia de absorbancia entre las dos soluciones (a pH 1.0 y pH 4.5) es proporcional a la concentración de antocianinas en la muestra (18).

i.5.3.4 Caracterización de antocianinas por espectroscopía de masas

La caracterización de antocianinas por espectroscopía de masas (MS) es una técnica analítica

que permite identificar con alta precisión la estructura molecular y la composición de estos pigmentos naturales. A diferencia de métodos como el HPLC-UV, que solo cuantifican las antocianinas basándose en su absorción, la espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS), proporciona información detallada sobre el peso molecular, la fragmentación y la composición elemental de estos compuestos. En el análisis, las antocianinas son ionizadas mediante técnicas como electrospray (ESI) en modo positivo, ya que estas moléculas presentan carga positiva en condiciones ácidas. Esto permite detectar los iones moleculares $[M]^+$ y sus fragmentos (Figura 5), lo que ayuda a diferenciar entre distintos tipos de antocianidinas (por ejemplo, cianidina, delfinidina, peonidina) y sus derivados glicosilados (por ejemplo, cianidina-3-glucósido) (19).

La ionización por electrospray (ESI) es una técnica de ionización en espectrometría de masas que permite analizar moléculas grandes y sensibles, como proteínas y compuestos polares, sin causar fragmentación excesiva (ionización suave). El sistema consta de una aguja de electrospray metálica que aplica alto voltaje (2–5 kV) a una solución de muestra, generando un aerosol de pequeñas gotas cargadas que, al evaporarse con ayuda de un gas de desolvatación (N_2), liberan iones gaseosos hacia el espectrómetro (esto ocurre en la fuente de iones). Estos iones pasan por un capilar a altas temperaturas y luego son separados según su relación masa/carga (m/z) en el analizador de masas para luego ser identificados por el detector. La ESI opera en modo positivo para moléculas que ganan protones (como antocianinas en medio ácido) o en modo negativo para compuestos que pierden protones (20).

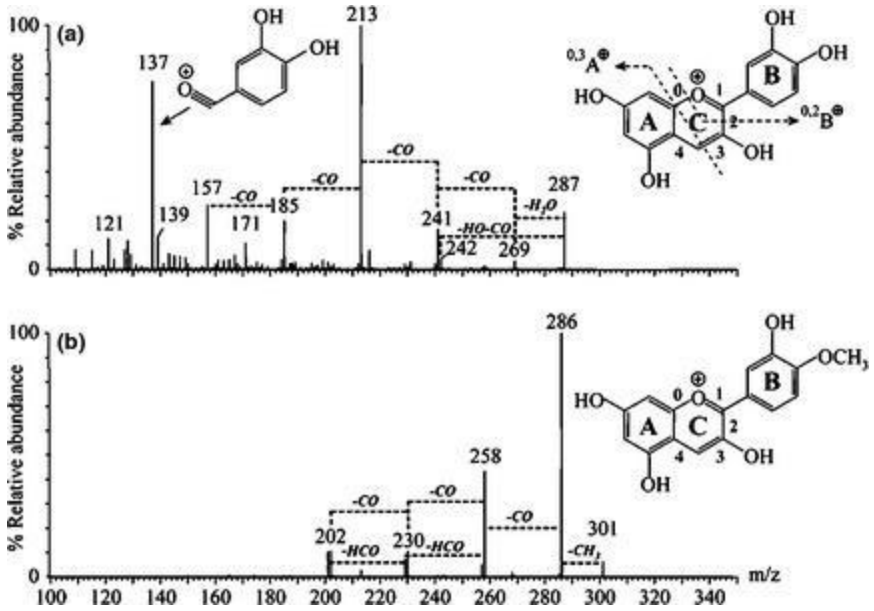


Figura 5. Ejemplo de un espectro de masas y fragmentaciones de una antocianina.

Fuente: Obtenido de (21).

i.5.4 Estabilidad de las antocianinas a factores ambientales

i.5.4.1 Factor pH

La estabilidad de las antocianinas está estrechamente relacionada con el pH del medio, ya que este factor determina su estructura química y, por ende, su coloración y resistencia a la degradación. En medios ácidos (pH < 3), las antocianinas predominan en su forma más estable, el catión flavilio, que les confiere un color rojo intenso. A medida que el pH aumenta (pH >3), las antocianinas siguen dos posibles caminos: desprotonaciones sucesivas o un ataque nucleofílico del agua en la posición C2 del anillo C. El primer camino conduce a la formación de compuestos coloreados llamados bases quinonoides neutras y aniónicas. El segundo camino conduce a la formación de sustancias incoloras conocidas como hemiacetales, que posteriormente se convierten en (cis)-chalcona o (trans)-chalcona. Estas formas incoloras son las menos estables de las antocianinas ya que son degradadas de manera irreversible a

aldehídos y ácidos fenólicos más pequeños (25, 30).

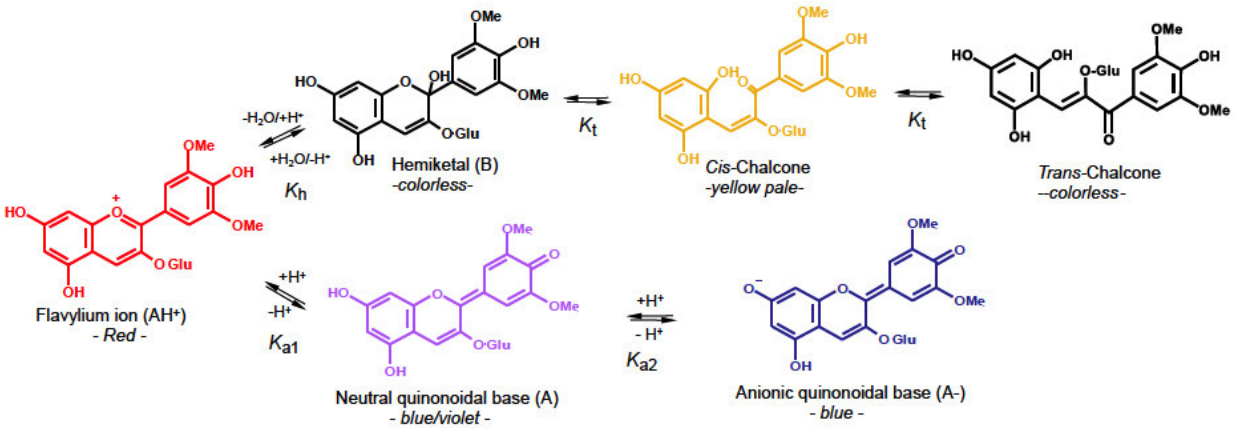


Figura 6. Alteración en la estructura de las antocianinas inducida por el pH.

Fuente: Obtenido de (24).

i.5.4.2 Factor temperatura

La estabilidad de las antocianinas se ve significativamente afectada por la temperatura, mostrando una marcada tendencia a degradarse conforme ésta aumenta. Estudios sugieren que a temperaturas de refrigeración (4 °C), las antocianinas pueden mantener más del 90 % de su concentración inicial durante varias semanas, mientras que a temperatura ambiente (25 °C) su vida media se reduce considerablemente, y por encima de 60 °C la degradación se vuelve muy rápida. La degradación ocurre debido al favorecimiento del ataque nucleofílico del agua por el aumento de temperatura, formando los compuestos incoloros hemiacetales y chalconas que conducen a la degradación irreversible de las antocianinas (4).

Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica analítica que mide los cambios de masa de una muestra en función de la temperatura o el tiempo bajo condiciones controladas de atmósfera (inerte, oxidante o reductora). El principio básico consiste en colocar la muestra en

un crisol de platino o alúmina dentro de un horno programable, el cual incrementa la temperatura siguiendo una rampa predeterminada (generalmente desde temperatura ambiente), mientras una balanza de alta precisión (con sensibilidad en microgramos) registra continuamente la pérdida o ganancia de peso asociada a fenómenos como descomposición térmica, deshidratación, oxidación o volatilización de componentes. Con los datos obtenidos se generan curvas termogravimétricas (TG) y sus derivadas (DTG), permitiendo cuantificar diversos eventos como, por ejemplo, la pérdida de humedad (25–150 °C), descomposición de materia orgánica (200–500 °C) o formación de cenizas (>600 °C) (25).

i.5.4.3 Factor luz

La estabilidad de las antocianinas se ve significativamente afectada por la exposición a la luz. Estudios han demostrado que la luz puede acelerar la degradación de estas moléculas, reduciendo su concentración y alterando el color de los productos que las contienen en comparación a cuando están protegidas en la oscuridad. También se ha determinado que la exposición a la luz de las antocianinas, además de disminuir su concentración, también disminuye sus propiedades antioxidantes (4).

i.5.5 Copigmentación de antocianinas

La copigmentación es un fenómeno molecular que ocurre entre pigmentos, tales como las antocianinas, y otras moléculas no coloreadas (copigmentos), resultando en modificaciones significativas en las propiedades ópticas del sistema. Este proceso implica principalmente interacciones no covalentes, como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y apilamiento π-π entre los anillos aromáticos del pigmento y el copigmento. Como consecuencia, se produce un desplazamiento hipso- o batocrómico en el espectro de absorción y un incremento en la intensidad de color (efecto hipercrómico) (Figura 7). La copigmentación

estabiliza la forma coloreada de las antocianinas (forma de ión flavilio), disminuyendo su susceptibilidad a su degradación, como la hidrólisis o el ataque nucleofílico de agua en medios por encima de pH 3 (16).

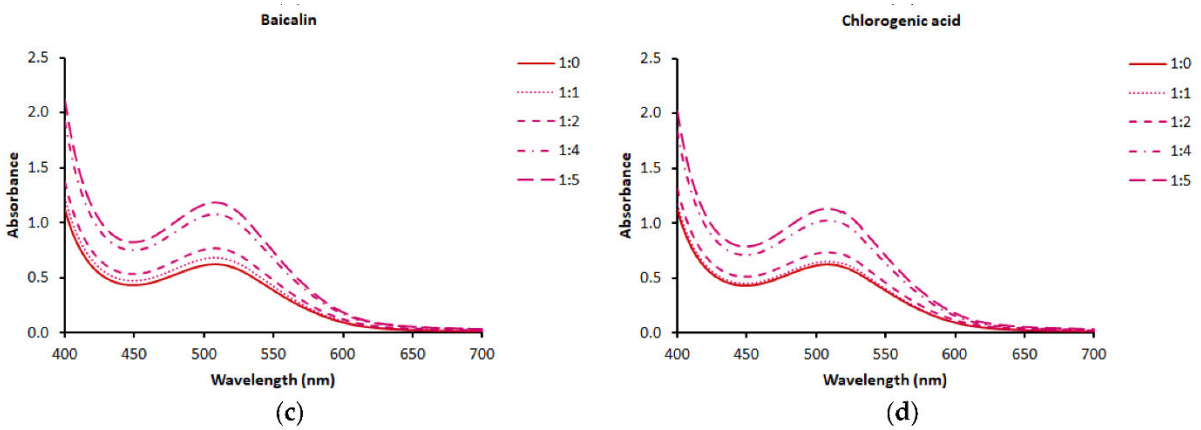


Figura 7. Ejemplos de espectros de absorción de soluciones de antocianinas copigmentadas.

Para que una molécula actúe eficazmente como copigmento, debe poseer ciertas características estructurales específicas. Un requisito fundamental es la presencia de un sistema conjugado de dobles enlaces que permita la formación de interacciones de apilamiento π-π estables con el núcleo aromático de las antocianinas. Además, la existencia de grupos funcionales donadores o aceptores de enlaces puente de hidrogeno, como grupos hidroxilo, carbonilo o carboxilo, facilita la formación de enlaces de hidrógeno adicionales, fortaleciendo la interacción entre el pigmento y el copigmento. La eficiencia de la copigmentación no solo depende de la presencia de estos grupos, sino también de su número y de su disposición espacial (16).

Entre los copigmentos fenólicos más comunes se encuentran los ácidos hidroxicinámicos (por ejemplo, ácido ferúlico, ácido cinámico, ácido sinápico), los ácidos benzoicos sustituidos (como el ácido gálico y el ácido 4-hidroxibenzoico) y los flavonoides (por ejemplo, quercetina, rutina y kaempferol). Estas moléculas poseen sistemas conjugados de dobles enlaces capaces de formar interacciones π- π, así como también múltiples grupos funcionales aceptores y

donadores de enlaces puente de hidrógeno, lo que las hace efectivas en procesos de copigmentación (16,23).

Además, se han identificado copigmentos no fenólicos, como ciertos aminoácidos, azúcares y polisacáridos. Aunque estos compuestos carecen de sistemas aromáticos extensamente conjugados, pueden participar en la copigmentación principalmente a través de la formación de redes de enlaces de hidrógeno y la creación de efectos de exclusión estérica que limitan el acceso de moléculas desestabilizadoras, como el agua, al núcleo del pigmento. Esta interacción no específica también contribuye a la estabilización de la forma catiónica coloreada del pigmento, ampliando las posibilidades de aplicación de la copigmentación en sistemas naturales y formulaciones industriales (16,23).

La copigmentación alcanza su máxima eficiencia en un rango de pH comprendido entre 3 y 5, condiciones bajo las cuales se observa de manera más pronunciada la intensificación del color con concentraciones crecientes de copigmento. En medios con pH inferiores a 3, las antocianinas se encuentran predominantemente en su forma de ion flavilio, altamente estable y ya intensamente coloreada, por lo que la adición de un copigmento no genera un cambio significativo en la coloración observable, limitando el efecto de la copigmentación. Además, se ha establecido que el fenómeno de copigmentación es más eficiente con agua como solvente. El agua, debido a su capacidad para formar enlaces de hidrógeno, favorece la proximidad y orientación adecuada entre el pigmento y el copigmento, facilitando tanto las interacciones π-π como los enlaces puente de hidrógeno. Por el contrario, en presencia de solventes orgánicos, la copigmentación se ve considerablemente disminuida, debido a una menor estabilización de las interacciones intermoleculares entre pigmento y copigmento (26).

i.5.5.1 Auto asociación de antocianinas

Además de la copigmentación, las antocianinas pueden experimentar un fenómeno conocido como autoasociación (Figura 8), en el cual las propias moléculas de antocianina interactúan entre sí, principalmente mediante interacciones π-π entre sus sistemas aromáticos conjugados. Esta asociación molecular contribuye a una estabilización adicional de la forma catiónica (ion flavilio) de las antocianinas, reduciendo su susceptibilidad a reacciones de hidratación y degradación, y resultando en una intensificación del color similar a la observada en la copigmentación con otras moléculas.

Al igual que en la copigmentación, la autoasociación es favorecida en medios acuosos y pH ácidos en donde la forma flavilio es estable y predomina en solución. La autoasociación de antocianinas ocurre a concentraciones mayores a 0,1 mM, por lo que, a concentraciones bajas de antocianinas, la probabilidad de autoasociación disminuye, haciendo que los efectos sean menos perceptibles. Además, podría existir una competencia entre la autoasociación y la copigmentación de antocianinas con otros copigmentos (16).

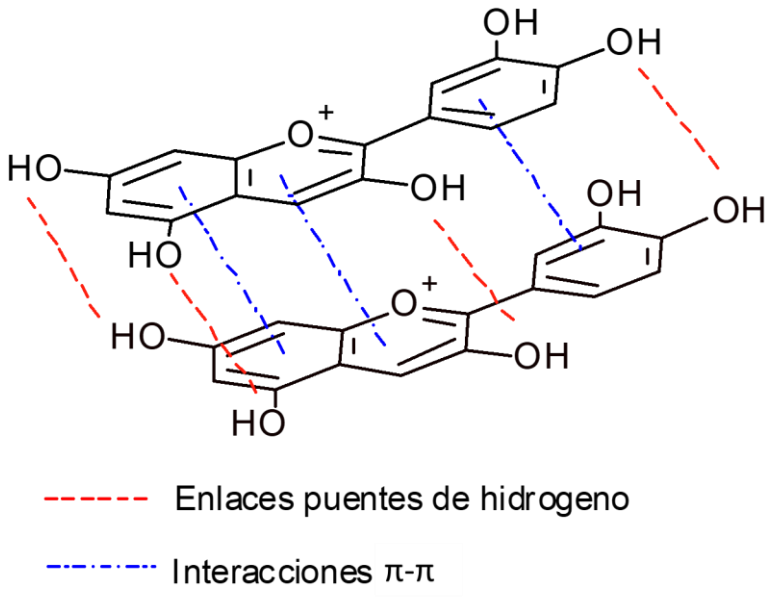


Figura 8. Formación de complejos entre antocianinas por autoasociación.

i.5.5.2 Copigmentación intramolecular e intermolecular

La copigmentación puede clasificarse en dos tipos principales según la naturaleza de la interacción: copigmentación intramolecular y copigmentación intermolecular. Aunque ambas conducen a una estabilización del color, difieren en la forma en que el pigmento y el copigmento interactúan.

La copigmentación intramolecular ocurre cuando el pigmento y el copigmento están unidos covalentemente dentro de la misma molécula. En este caso, el copigmento está enlazado a la estructura del pigmento a través de una azúcar y un grupo acilo, permitiendo que ambos sistemas aromáticos permanezcan en proximidad constante (alineados de forma paralela) y adopten una conformación favorable para la interacción π-π y la formación de enlaces puente de hidrógeno. La acilación de las antocianinas puede ocurrir más de una vez, formando una estructura tipo "sándwich" en donde ambos copigmentos unidos mediante un grupo acilo a las antocianinas se orientan de forma paralela a la vez (Figura 9) (16,23).

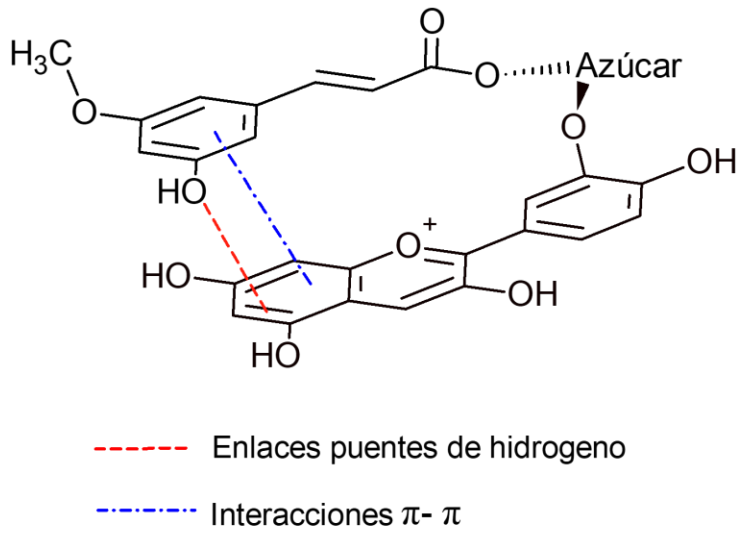


Figura 9. Formación de un complejo entre antocianina y copigmento ferúlico mediante un azúcar.

Por otro lado, la copigmentación intermolecular implica la asociación no covalente entre dos moléculas independientes: una molécula de pigmento y una de copigmento. Esta interacción está mediada principalmente por fuerzas interacciones π-π y enlaces puente de hidrógeno, y su estabilidad depende de múltiples factores externos, como la concentración, el pH, la polaridad del medio y la temperatura. Además, se sabe que hay una competencia entre los procesos de autoasociación de antocianinas y la copigmentación intermolecular e intramolecular (Figura 10) (16).

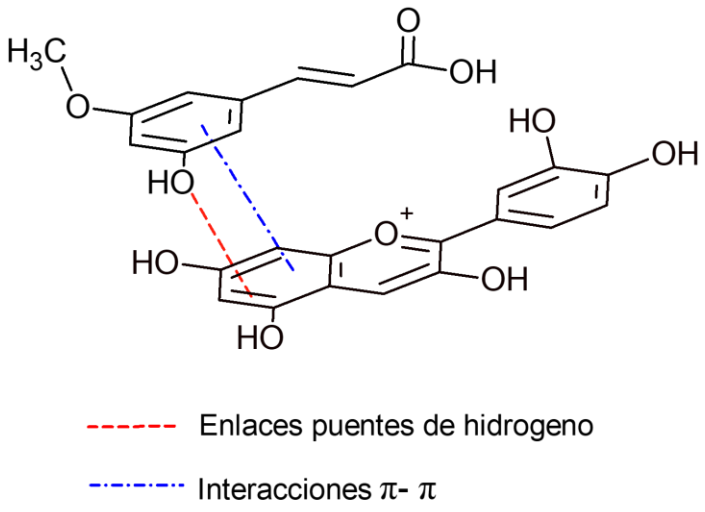


Figura 10. Formación de un complejo entre antocianina y copigmento ferúlico.

i.5.5.3 Complejos antocianina-metal

Además de la copigmentación clásica mediada por interacciones π-π y enlaces puente de hidrógeno, las antocianinas también pueden formar complejos con iones metálicos, en un proceso denominado copigmentación con metales. En este tipo de interacción, los iones metálicos actúan como puentes de coordinación entre diferentes grupos funcionales de la molécula de antocianina —principalmente grupos hidroxilo y carbonilo—, promoviendo la formación de complejos estables que resultan en modificaciones espectrales significativas, como desplazamientos hipercrómicos y batocrómicos.

Entre los metales que comúnmente participan en este fenómeno se encuentran Al^{+3}, Fe^{+3} y Mg^{+2}. La capacidad de formar complejos depende de la naturaleza del metal (estado de oxidación, geometría de coordinación preferida) y de la estructura de la antocianina (número y posición de grupos donadores de electrones). Generalmente, las antocianinas con sustituciones hidroxiladas del anillo B son preferidas para la coordinación metálica (Figura 11) (16,23).

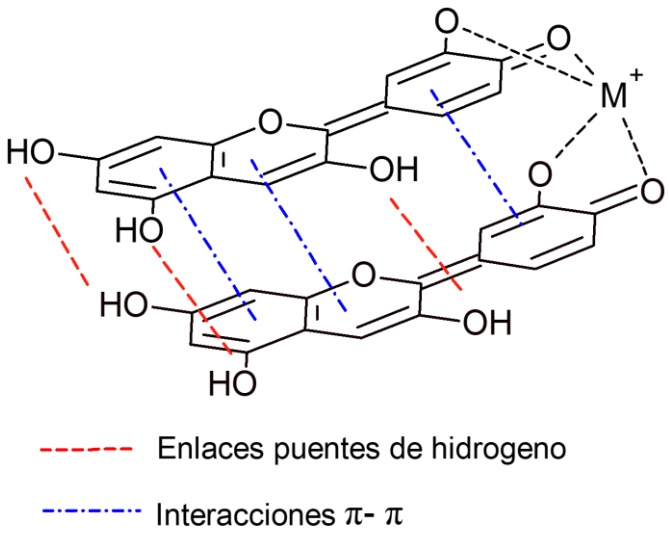


Figura 11. Formación de un complejo entre antocianina y antocianina mediante un metal (M^{+}).

i.5.5.4 Copigmentación con polímeros

Otro tipo relevante de fenómeno es la copigmentación con polímeros, donde las antocianinas interactúan con macromoléculas poliméricas, resultando en una estabilización del color y una mejora en la estabilidad de los pigmentos. A diferencia de la copigmentación tradicional con pequeñas moléculas, los polímeros ofrecen múltiples sitios de interacción simultánea, lo que incrementa la estabilidad de las antocianinas.

Las interacciones entre antocianinas y polímeros involucran distintos tipos de fuerzas, como interacciones π-π, puentes de hidrógeno, fuerzas hidrofóbicas, y particularmente, interacciones electrostáticas. Estas últimas son especialmente relevantes cuando las antocianinas están en forma de ion flavilio a pH ácido se encuentran en presencia de polímeros aniónicos, como polisacáridos cargados negativamente (por ejemplo, kappa-carragenano y sulfato de condroitina). La atracción electrostática entre las cargas opuestas facilita la formación de complejos estables, que estabilizan a las antocianinas (27).

Ácido poliaspártico y poliaspartato de sodio

El ácido poliaspártico es un poliaminoácido sintético, soluble en agua, no tóxico y biodegradable. Estructuralmente, el AP es un polímero lineal constituido por unidades de ácido aspártico en las configuraciones L- y D-, unidas a través de enlaces peptídicos tipo α y β (Figura 12). Esta combinación de enlaces y configuraciones confiere al polímero flexibilidad estructural y una alta densidad de grupos carboxilo ionizables a lo largo de su cadena. Uno de los principales derivados de este polímero es el poliaspartato de sodio, que se obtiene mediante hidrólisis alcalina controlada de polisuccinimida. El peso molecular del NaPAS puede variar considerablemente, típicamente en el rango de 6200 a 44800 g/mol (28,29).

Debido a la abundancia de grupos carboxilato ($-COO^-$) en su estructura, tanto el ácido poliaspártico como su forma sódica presentan una alta densidad de carga negativa en solución acuosa. Esta característica los convierte en polímeros aniónicos ideales para interactuar de manera electrostática con moléculas cargadas positivamente, como las antocianinas en su forma de ion flavilio, predominante a pH ácido. Así, se espera que este poliaminoácido forme complejos estables con antocianinas a través de interacciones electrostáticas, complementadas posiblemente por puentes de hidrógeno entre los grupos carboxilo del polímero y los grupos

hidroxilo de las antocianinas. Estas asociaciones no solo pueden intensificar el color observado, sino también conferir una mayor estabilidad de las antocianinas.

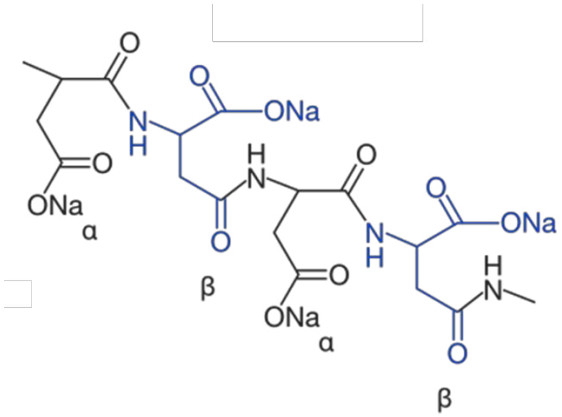


Figura 12. Enlaces peptídicos α y β en la estructura del ácido poliaspártico (AP).

i.5.6 Antioxidantes

i.5.6.1 Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas altamente reactivas que contienen uno o más electrones desapareados en su capa externa, lo que les confiere una notable inestabilidad termodinámica. Esta característica les permite reaccionar rápidamente con biomoléculas circundantes, como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, alterando su estructura y función (30).

En sistemas biológicos, los radicales libres más relevantes corresponden principalmente a las especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el radical hidroxilo (•OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), aunque también existen especies reactivas de nitrógeno (RNS) como el dióxido de nitrógeno ($NO_2\bullet$). Los radicales libres participan en funciones fisiológicas esenciales, como la señalización celular, la respuesta inmune y la regulación del crecimiento celular (31,32).

i.5.6.2 Estrés oxidativo y antioxidantes

Cuando la generación de radicales libres excede la capacidad de neutralización de los sistemas antioxidantes, se produce un desequilibrio conocido como estrés oxidativo, que ha sido asociado con el desarrollo y progresión de múltiples enfermedades (33).

Los antioxidantes son compuestos capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas al neutralizar especies reactivas, como los radicales libres, antes de que estos causen daño celular o molecular. Su principal mecanismo de acción consiste en donar un electrón o un átomo de hidrógeno a los radicales libres, estabilizándolos sin volverse ellos mismos radicales reactivos. Entre los antioxidantes naturales más conocidos se encuentran los compuestos fenólicos, como flavonoides, así como la vitamina C, carotenoides y enzimas como la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (32).

i.5.6.3 Mecanismos de acción antioxidante de flavonoides

Los mecanismos en los cuales puede actuar un antioxidante de tipo flavonoide son principalmente 3 (34):

1. Transferencia única de electrón vía transferencia de protón
2. Transferencia de un átomo de hidrógeno
3. Quelación de metales de transición

Transferencia única de electrón vía transferencia de protón

Este proceso implica la transferencia de un electrón por parte del antioxidante (simbolizado A-OH) hacia un radical libre (simbolizado B•), lo cual transforma a este último en una forma aniónica menos reactiva (simbolizado B-). Posteriormente, dicho anión puede reaccionar con hidrógenos, formando compuestos estables. En este mecanismo, el antioxidante se convierte en un catión radicalario (simbolizado $A–OH^{\bullet+}$), una especie relativamente estable debido a la

deslocalización electrónica que se produce en estructuras aromáticas. Por ello, los flavonoides y otros compuestos fenólicos con estructuras aromáticas conjugadas son eficientes bajo este mecanismo, ya que su capacidad para estabilizar el catión radical a través de resonancia permite que la reacción de neutralización de radicales sea termodinámicamente favorable (34).

$$A - OH + B\bullet \longrightarrow A - OH\bullet + + B-$$

Transferencia de un átomo de hidrógeno

El mecanismo de transferencia de átomo de hidrógeno es un mecanismo en el cual los antioxidantes (simbolizado B-OH) neutralizan radicales libres (simbolizado A•) al transferir simultáneamente un electrón y un protón, estabilizando así la especie radicalaria (simbolizado A-H). Este proceso está regido, en gran medida, por la energía de disociación del enlace del grupo donador de hidrógeno, mientras menor sea esta energía, mayor será la facilidad con la que una molécula puede actuar como donadora. En el caso de los flavonoides, esta capacidad se relaciona estrechamente con su estructura molecular. La disposición de grupos hidroxilo, la conjugación en los anillos aromáticos y la presencia de enlaces insaturados y carbonilos contribuyen significativamente a su eficacia como antioxidantes. Estructuras moleculares de este tipo permiten la formación de radicales flavonoides estables (simbolizado B•) mediante deslocalización electrónica, lo que limita la propagación de reacciones oxidativas (34).

$$A\bullet + B - OH \longrightarrow A - H + B\bullet$$

Quelación de metales de transición

La quelación de metales de transición es un mecanismo antioxidante mediante el cual ciertos compuestos orgánicos, especialmente polidentados como los flavonoides, forman enlaces de coordinación múltiples con átomos metálicos, disminuyendo así su participación en reacciones redox generadoras de radicales libres. Este proceso ocurre de forma natural en el organismo y es crucial en la regulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Metales como el hierro (Fe), cobre (Cu), manganeso (Mn) y cobalto (Co) pueden catalizar la formación de radicales hidroxilos. La capacidad de los flavonoides para quelar estos metales les permite inhibir su participación en dichas reacciones, reduciendo significativamente la generación de ROS. Esta propiedad depende fuertemente de la estructura química del flavonoide, en particular de la presencia de grupos hidroxilo en posiciones específicas del anillo B y de sistemas conjugados que permitan la formación de complejos estables con iones metálicos (Figura 13) (34).

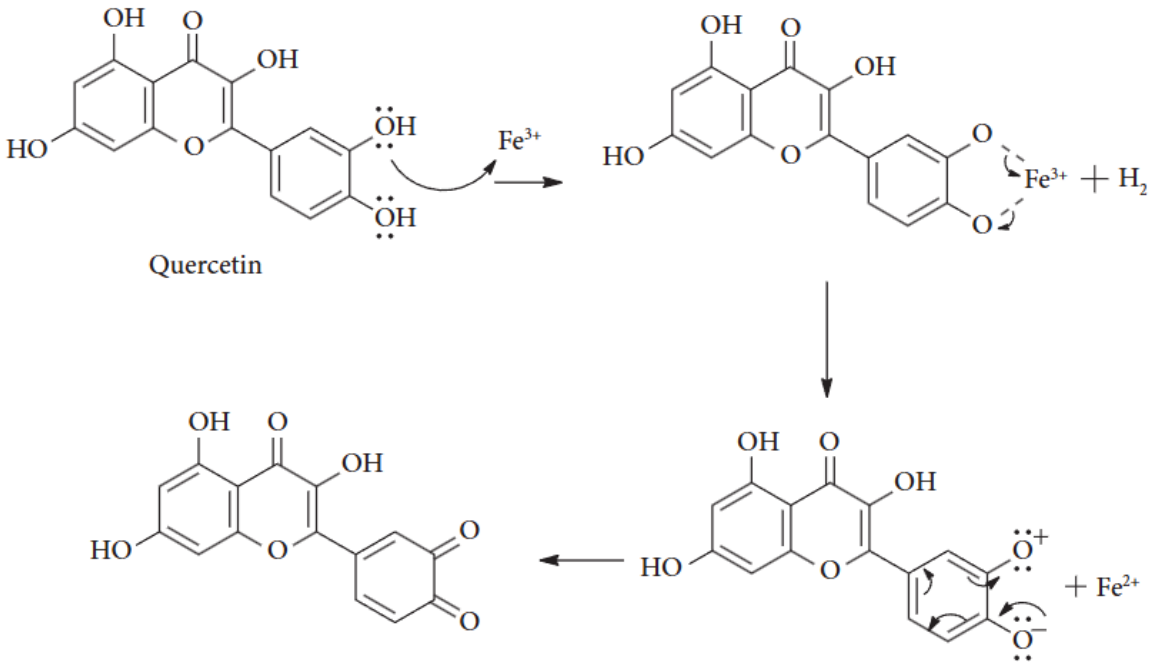


Figura 13. Mecanismo de quelación de metales por un antioxidante.

Fuente: Obtenido de (34).

i.5.6.4 Peroxidación lipídica

Los lípidos son componentes fundamentales en las células, no solo por su papel estructural, sino también por su participación en múltiples procesos biológicos esenciales. Forman parte de la bicapa lipídica de las membranas celulares, garantizando la integridad y funcionalidad de las células. Además, representan una fuente energética y funcionan como señalizadoras. Las ROS en exceso pueden dañar la integridad estructural y funcionalidad de los lípidos, especialmente aquellos que forman parte de las membranas celulares. Los ácidos grasos poliinsaturados, presentes en abundancia en estas membranas, son susceptibles a sufrir oxidación debido a la presencia de enlaces dobles conjugados en su estructura, los cuales facilitan la captación de hidrógenos por parte de los radicales libres. Esta oxidación es conocida como peroxidación lipídica y puede iniciarse por diversas ROS, como el radical hidroxilo (•OH), el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La interacción de estas especies con los lípidos provoca la formación de radicales lipídicos inestables que perpetúan una reacción en cadena, formando productos finales tóxicos como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE) (Figura 14) (35).

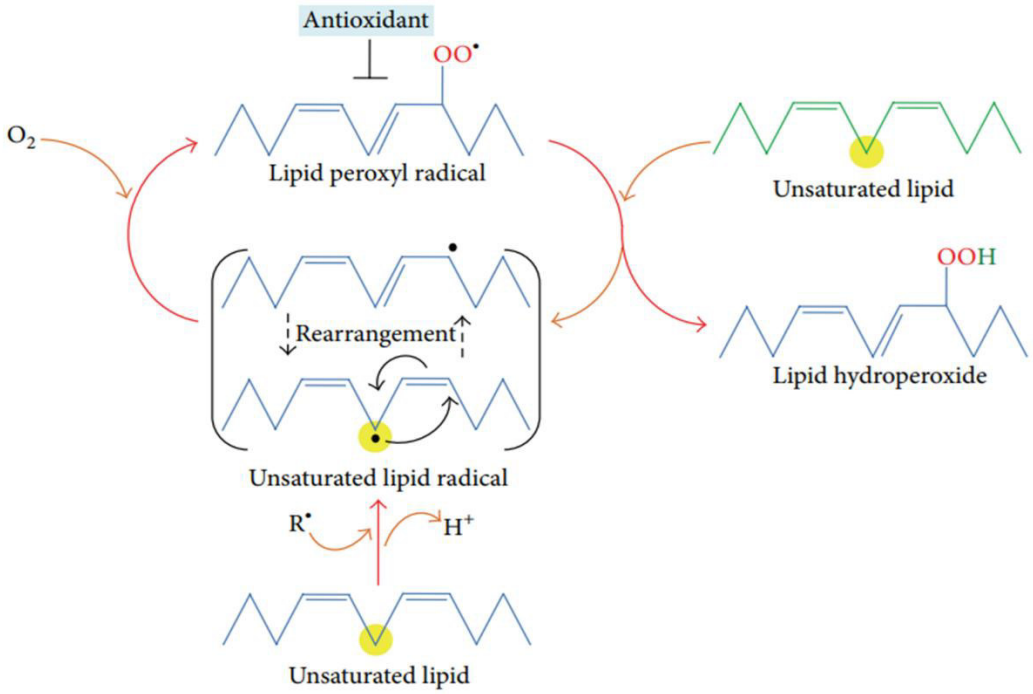


Figura 14. Mecanismo de peroxidación lipídica en lípidos insaturados inducida por ROS.

Fuente: Obtenido de (35).

Los antioxidantes desempeñan un papel fundamental en la prevención y control de la peroxidación lipídica al interferir con las distintas etapas de esta reacción en cadena inducida por ROS. Su principal mecanismo de acción consiste en neutralizar los radicales libres o en impedir su formación, protegiendo así a los lípidos, especialmente a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, de la oxidación (35).

Método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

El método TBARS es una técnica ampliamente utilizada para evaluar el nivel de peroxidación lipídica en tejidos. En este ensayo, el MDA reacciona con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) bajo condiciones ácidas y de alta temperatura, formando el complejo coloreado [MDA-$(TBA)_2$] de color rosado, el cual puede ser cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de aproximadamente 532 nm (Figura 15). No obstante, el método TBARS presenta ciertas limitaciones, ya que el TBA puede reaccionar

con otras sustancias además del MDA, lo que puede llevar a una sobreestimación de los niveles reales de peroxidación. A pesar de ello, continúa siendo un método útil y aceptado para estudios de estrés oxidativo en lípidos (32).

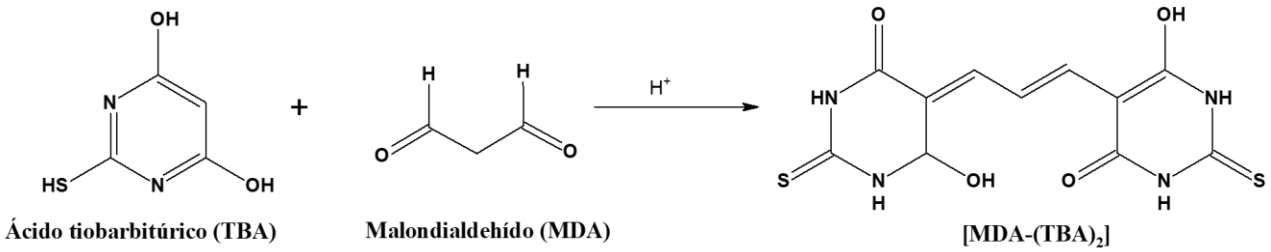


Figura 15. Reacción de formación del compuesto coloreado [MDA-$(TBA)_2$].

i.6 Antecedentes del estudio

Elucidación de antocianinas presentes en el camu-camu (*Myrciaria dubia*)

(36) identificaron a través de cromatografía HPLC−PDA, HPLC−MS y RMN las estructuras presentes en los extractos de 95 % etanol/1,5 N HCl (85:15, v:v) de la cascara de camu-camu, para lo cual identificaron que el pigmento principal (entre 88 – 90 %) era la antocianidina Cianidina 3-O-glucosido y el pigmento secundario (entre 4 – 5 %) la antocianidina Delfinidina 3-O-glucosido. De manera similar, (37) identificaron la presencia de Cianidina 3-O-glucosido y Delfinidina 3-O-glucosido en la cáscara de camu-camu, mientras que en la pulpa solo se identificó Cianidina 3-O-glucosido.

Cuantificación de antocianinas presentes en el camu-camu (*Myrciaria dubia*)

(36) detectaron el contenido total de antocianinas presentes en los extractos de la cascara del camu-camu, este valor fue de 30-55 mg por cada 100 g de muestra. En otra investigación realizado por (37), cuantificaron 298 y 468 mg/100 g de cáscara de delfinidina-3-glucósido y cianidina-3-glucósido en extractos de etanol/agua 80:20 acidificadas con ácido cítrico. En otra investigación llevada a cabo por (38), se realizó la cuantificación del contenido de antocianinas

totales de cada parte del camu-camu por separado. Para la cáscara se obtuvo 107,2±2,6 µg/g de muestra. Para la pulpa se obtuvo 13,6±1,3 µg/g de muestra. Para la mezcla de cáscara y pulpa se obtuvo 50,7±1,5 µg/g de muestra. Para el caso en que se tomó como muestra la fruta completa, se obtuvo 29,9±0,6 µg/g de muestra. Por último, para la semilla de la fruta no se detectó la presencia de antocianinas totales.

Actividad biológica del extracto del camu-camu contra la enfermedad de Alzheimer

Existen investigaciones donde se trabajó con extractos obtenidos de camu-camu para su aplicación en diversos factores de la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, se tiene el trabajo de (39), en donde se estudió el efecto neuroprotector del residuo de camu-camu aplicado en el modelo *in vivo* de C. elegans. Los resultados obtenidos fueron que las protoantocianinas presentes en los residuos de camu-camu fueron las responsables que redujeron significativamente la parálisis inducida por la agregación de Aβ1–42. Por otro lado, en el trabajo de (40) comprobaron que el polvo de camu-camu tenía propiedades neuroprotectoras y que también era capaz de inhibir la lipoperoxidación en un modelo de moscas inducidas a estrés oxidativo con hierro, presentando niveles de MDA iguales a las de la muestra control.

Mejora de la estabilidad de las antocianinas del camu-camu debido a la copigmentación

(4), en su trabajo informa sobre la estabilidad y degradación de las antocianinas, ya que estas se ven influenciadas por una serie de factores como el pH, la luz, la temperatura, la copigmentación, los sulfitos, el ácido ascórbico, el oxígeno y las enzimas. Sin embargo, Enaru afirma que si logra minimizar la acción negativa de las antocianinas posteriormente se podrá potenciar sus efectos beneficiosos para la salud.

Existen diferentes estudios donde se indican que la copigmentación era un buen método para estabilizar antocianinas (23), sin embargo, hasta el momento no existe información sobre la

variación de la estabilidad de las antocianinas extraídas del camu-camu debido a la copigmentación.

Mejora de la actividad biológica de las antocianinas debido a la copigmentación

En el trabajo de (41), se evaluó la actividad antimicrobiana de las antocianinas extraídas de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) copigmentadas mediante la adición de algunos ácidos fenólicos tales como ácido ferúlico, cinámico y cumárico como copigmentos. Las bacterias probadas fueron *Bacillus subtilis* B505, *Escherichia coli* 0157, *Staphylococcus aureus* cultivadas en *Luria Bertani* y *Aspergillus niger* (CAIM 147). El estudio concluyó que los extractos de antocianinas copigmentadas con los ácidos cinámico y cumárico tuvieron un mayor diámetro de zonas de inhibición para todas las especies de bacterias estudiadas en comparación con el control. Para el caso de (42), se evaluó la actividad antioxidante de las antocianinas copigmentadas con los ácidos orgánicos (0,87 mg/mL, ácido ferúlico: ácido D-glucónico: ácido cafeico: ácido vainílico = 1,5 :2,5:2,5:0,5, p/p/p/p) promovida por alta presión hidrostática. El estudio concluyó que aumentó la tasa de actividad antioxidante potencial expresadas in vivo ($p < 0,01$ frente al grupo modelo). Por último, un estudio reciente de (43), se estudió el efecto de la copigmentación de antocianinas de camu–camu en el estrés oxidativo en cerebros. Los resultados mostraron que el extracto de antocianina copigmentado con resveratrol mejoró la protección al estrés oxidativo, con un valor de TBARS de 48 nmol/g, el cual fue menor que la antocianina sin copigmentar.

Estos estudios sugieren que la copigmentación podría mejorar las propiedades de las antocianinas.

HIPÓTESIS Y VARIABLES

i.7 Hipótesis

La copigmentación de antocianinas de cáscara de camu-camu influye en la estabilidad y actividad protectora al estrés oxidativo.

i.8 Variables

Variables independientes

- Relación de masas antocianina/copigmento
- Estructura del copigmento

Variables dependientes

- Efectos hipercrómicos y/o batocrómicos
- Rango de temperatura de degradación de antocianinas copigmentadas.
- Porcentaje de antocianinas remanentes después de 24 h a pH 7,4 y 37 °C
- Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

ii MATERIALES Y MÉTODOS

ii.1 Procedimientos

ii.1.1 Extracción de antocianinas de cáscara de camu-camu.

Aproximadamente 10 Kg de camu-camu en estado maduro se lavaron y pelaron para obtener las cáscaras. Las cáscaras se secaron por liofilización y se molieron hasta obtener un polvo fino. La fruta de camu-camu fue adquirida en el Mercado Municipal Gran Mariscal Ramón Castilla y provenía de la región de Loreto. Para la optimización de la extracción de antocianinas de la cáscara se probaron los factores tiempo y relación m/v usando como solvente etanol según estudios anteriores. La cuantificación se realizó por el método espectrofométrico de pH diferencial usando agua destilada como blanco (18). La concentración de antocianinas en la

cáscara de camu-camu se calculó con la Ecuación 1.

Ecuación 1:

$$AMT\ \left(\frac{mg}{100g}\right) = \frac{A\ x\ 449{,}2\ g/mol\ x\ DFx100}{26900\ L.mol^{-1}cm^{-1}.x\ l\ cm} x \frac{V}{W}$$

En donde:

- AMT son antocianinas monoméricas totales como equivalentes de cianidina-3-glucósido en mg por cada 100 g de polvo de cáscara de camu-camu.
- $A = (A_{515} - A_{700})_{pH=1,0} - (A_{515} - A_{700})_{pH=4,5}$
- 449,2 es el peso molecular de cianidina-3-glucósido (g/mol).
- DF es el factor de dilución.
- 26900 es el coeficiente de absortividad molecular en buffer acuoso ($L.mol^{-1}cm^{-1}$).
- l es el camino óptico de la celda (1 cm).
- V es el volumen final de la solución en mL.
- W es la masa de polvo de la cáscara de camu-camu en mg.

ii.1.2 Caracterización de antocianinas presentes en cáscara de camu-camu

El primer paso de la caracterización consistió en purificar el extracto de antocianinas de camu-camu (ACC). El extracto optimizado de antocianinas de cáscara de camu-camu se secó en un rotavapor a vacío y se reconstituyó en agua acidificada a pH 2. Este extracto se purificó con la resina iónica Lewatit S 7968 (44). Antes de la purificación, la resina se lavó 3 veces con agua destilada a pH 2 y las antocianinas se eluyeron con etanol. El extracto purificado se secó en un rotavapor a vacío y se procedió a caracterizar a las antocianinas por espectroscopía de masas. En un vial se mezclaron 3 mg de la muestra y 3 ml de una solución (8:2) metanol (5 %

CH_3COOH) - agua (5 % CH_3COOH). La mezcla se colocó en baño de ultrasonido durante 5 minutos. Luego, la solución se pasó a través de un filtro de disco de 0,25 µm hacia un vial HPLC y se procedió a la lectura en el instrumento. Se utilizó un cromatógrafo UPLC Dionex Ultimate 3000 UHPLC system (Thermo Scientific), volumen de inyección: 2 µl, columna: Luna© Omega C18 100 Å, Phenomenex (150x 2,1 mm, 1,6 µm), temperatura de columna: 40 °C y flujo: 0,25 ml/min. Los eluyentes utilizados fueron A: H_2O 0,1 % HCOOH B: ACN 0,1 % HCOOH. Se mantuvo 90 % de solvente A por 1 min. Luego, se usó un gradiente de solvente A desde 90 % hasta 5 % hasta el minuto 23. Se mantuvieron estas condiciones hasta el minuto 25. Luego, se usó un gradiente de solvente A desde 5 % hasta 90 % hasta el minuto 26. Por último, se mantuvieron estas condiciones hasta el minuto 32.

El espectrómetro de masas fue un Q Exactive Plus (Thermo Scientific). Los parámetros de scan full MS fueron: Rango: 200 - 1500 m/z, Resolución: 70 000, Microscans: 1, AGC target: 3x 106, Maximum IT: 100 ms. Los parámetros MS2 fueron: Resolución: 17 500, AGC target: 1x 105, Maximum IT: 50 ms. Los parámetros de fuente de ionización fueron: Fuente y modo de ionización: HESI (negativo/positivo), Voltaje de spray: 2,8/3,5, Temperatura de capilar: 280 °C/260 °C, Gas carrier: N_2 (Sheath gas flow rate: 40, Aux gas flow rate: 10), Gas heater temp: 300 °C, S-lens RF level: 60 y Normalized collision energy: 20, 30, 40.

ii.1.3 Copigmentación de antocianinas de cáscara de camu-camu

La copigmentación se realizó según estudios previos con modificaciones (42). Para la copigmentación se usaron 3 copigmentos fenólicos disueltos en etanol a pH 3,0: ácido ferúlico (AF), ácido cinámico (AC) y resveratrol (RE). Adicionalmente se usó el polímero ácido poliaspártico (AP) como copigmento disuelto en buffer citrato a pH 3,0. La solución de ACC de trabajo se preparó diluyéndola con buffer citrato a pH 3,0 hasta una concentración de

antocianinas de 60 mg/L y se centrifugó.

Se combinaron volúmenes iguales de ACC con las soluciones de copigmentos fenólicos en concentraciones crecientes para satisfacer las relaciones de masa 1:20, 1:40, 1:60 y 1:80 (antocianina:copigmento) y se diluyeron con buffer pH 3,0. Las soluciones se dejaron en oscuridad durante 20 min.

Tabla 3. Relaciones de masa de las antocianinas y los copigmentos fenólicos.

Relación m/m	Copigmentación con AF	Copigmentación con AC	Copigmentación con RE
1:20	AF20	AC20	AR20
1:40	AF40	AC40	AR40
1:60	AF60	AC60	AR60
1:80	AF80	AC80	AR80

Por otro lado, se combinaron volúmenes iguales de ACC con soluciones de AP en concentraciones crecientes para satisfacer las relaciones de masa 1:10, 1:12, 1:14, 1:16, 1:18 y 1:20 (antocianina:copigmento) y se diluyeron con etanol pH 3,0. Las soluciones se dejaron en oscuridad durante 20 min. Aquellas relaciones de masa con las que se obtuvieron los mayores efectos hipercrómicos y/o batocrómicos se consideraron como las óptimas y se usaron para la doble copigmentación (combinación de AP con: AF, AC o RE).

Tabla 4. Relaciones de masa de las antocianinas y el ácido poliaspártico.

Relación m/m	Copigmentación con AP
1:10	AP10
1:12	AP12
1:14	AP14
1:16	AP16
1:18	AP18
1:20	AP20

En la doble copigmentación de ACC se combinaron volúmenes iguales de ACC, AP y copigmentos fenólicos en las concentraciones adecuadas para satisfacer aquellas relaciones de masa que obtuvieron los mayores efectos hipercrómicos y/o batocrómicos.

Todas las soluciones se midieron por espectrofotometría en el rango de 450 nm a 650 nm. Todas las muestras se compararon con una solución de antocianinas sin copigmentar. La concentración final de ACC en todas las soluciones fue de 20 mg/L.

Las ACC copigmentadas y sin copigmentar se liofilizaron para el análisis termogravimétrico y análisis FTIR.

Los efectos hipercrómicos (%A) y batocrómicos (%λ) de las ACC copigmentadas y sin copigmentar se calcularon según la ecuación 2 (45).

Ecuación 2:

$$\%A = \left(\frac{A - A_0}{A_0}\right) x100 \qquad \%\lambda = \left(\frac{\lambda - \lambda_0}{\lambda_0}\right) x100$$

En donde:

- A es la absorbancia máxima de las antocianinas copigmentadas
- A_0 es la absorbancia máxima de las antocianinas sin copigmentar
- λ es la longitud de onda de absorbancia máxima de las antocianinas copigmentadas
- λ_0 es la longitud de onda de absorbancia máxima de las antocianinas sin copigmentar

ii.1.4 Análisis termogravimétrico de ACC copigmentadas

Las muestras liofilizadas de ACC copigmentadas y sin copigmentar fueron sometidas a análisis mediante un equipo de análisis termogravimétrico modelo Discovery TGA5500. El estudio se realizó en un intervalo de temperaturas comprendido entre 30 y 500 °C, aplicando una velocidad de calentamiento de 10 °C por minuto, bajo una atmósfera controlada de nitrógeno con un flujo constante de 50 mL/min.

ii.1.5 Análisis FT-IR de ACC copigmentadas

Las muestras liofilizadas de ACC copigmentadas y sin copigmentar se combinaron con bromuro de potasio (KBr) en polvo seco para su análisis. Los espectros de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) se obtuvieron utilizando un espectrómetro modelo Nicolet IS10. Las mediciones espectrales se realizaron en un intervalo de 400 a 4000 cm^{-1}, empleando una resolución espectral de 4 cm^{-1} y acumulando 32 escaneos por muestra para mejorar la relación señal-ruido (42).

ii.1.6 Estabilidad de antocianinas copigmentadas a pH 7,4 y 37 °C

Una vez transcurrido el tiempo de copigmentación, las soluciones de antocianinas copigmentadas preparadas con las relaciones óptimas se diluyeron en un volumen equivalente de tampón fosfato salino (PBS) a pH 7,4 (46). Posteriormente, las muestras se incubaron en un termostato a 37 °C, bajo agitación constante y en condiciones de oscuridad. Se usó el método

de pH diferencial para la cuantificación de las ACC al inicio y después de 24 h del tratamiento térmico. El porcentaje de antocianinas remanentes (AR %) fue determinado según la Ecuación 3.

Ecuación 3:

$$AR\ \% = \frac{Masa\ de\ antocianinas\ después\ de\ 24\ horas\ (mg)}{Masa\ de\ antocininas\ iniciales\ (mg)}\ x\ 100$$

ii.1.7 Evaluación de estrés oxidativo *in vitro* por el método TBARS

Cerebros de pollo se homogenizaron en PBS pH 7,4 a una concentración de 10 % m/v y la solución obtenida se centrifugó por 5 minutos a 2500 rpm y 4 °C. Para la inducción del estrés oxidativo se realizó la metodología reportada por estudios anteriores (47) con algunas modificaciones. Se combinó ácido ascórbico 4 mM (45 µL) y $FeSO_4$ 2 mM (15 µL) con 900 µL de homogenizado de cerebro y 60 µL de muestra y se dejó reposar la mezcla por 30 min. Pasado el tiempo, se combinaron 300 µL de la mezcla con 600 µL ácido tricloroacético al 10 % y se calentó a 100 °C por 15 min. Luego, se agregaron 900 µL de ácido tiobarbitúrico 0,67 % y se calentó a 100 °C por 30 min. Las muestras se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se midió por espectrofotometría UV-VIS a 535 nm. La concentración de TBARS se calculó con la Ecuación 4.

Ecuación 4:

$$\frac{nmol\ TBARS}{g\ tejido\ cerebral} = \frac{A_{mp} x V_t}{\mathcal{E} x l x V_{mp} x (C_{ha} x D)} x 10^6 \qquad (\boldsymbol{Eq\ 3})$$

En donde A_{mp}: Absorbancia de la muestra problema, V_t: Volumen total de los tubos de reacción, $\mathcal{E}$: Coeficiente de extinción molar del complejo [MDA-$(TBA)_2$] ($1{,}56x10^5 M^{-1}cm^{-1}$), l: Longitud de la celda (1 cm), C_{hd}: Concentración del homogenizado de cerebro y D: Factor de dilución.

ii.2 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se utilizó la prueba de Tukey para los análisis estadísticos. Valores de $p<0,05$ se consideraron significativos.

iii RESULTADOS

iii.1 Extracción y caracterización de antocianinas de cáscara de camu-camu

Se probaron las relaciones de masa:solvente 1:10, 1:15 y 1:20 (Tabla 5), durante un tiempo de extracción de 15 minutos y temperatura ambiente. Los resultados mostraron que la relación masa:solvente óptima fue 1:15, con un valor de antocianinas monoméricas totales (AMT) de 342,97 mg/100g. El siguiente parámetro para optimizar la extracción fue el tiempo, probándose 15, 30 y 45 min (Tabla 5). Los resultados mostraron que el valor de AMT a 30 minutos (330.89 mg/100g) no tuvo diferencia significativa con respecto a la extracción a 15 minutos. Sin embargo, a 45 min empezó a notarse una menor extracción de AMT (292,40 mg/100g), posiblemente debido a que empiezan a degradarse en solución. Adicionalmente se probó el parámetro temperatura, pero las extracciones a temperaturas mayores a 25 °C condujeron a una rápida degradación de antocianinas. Por ello, los parámetros óptimos de extracción de antocianinas de camu-camu fueron: relación masa:solvente 1:15, tiempo:15 min y temperatura: 25 °C.

Tabla 5. Valores de AMT (en mg/100g) obtenidos en la optimización de la extracción.

Relación de masa	**AMT (mg/100g)**
1:10	237,96 ± 24,88b
1:15	342,97 ± 29,07a
1:20	248,03 ± 1,54b
Tiempo de extracción	**AMT (mg/100g)**
15 min	342,97 ± 29,07a
30 min	330,89 ± 19,29ab
45 min	292,40 ± 2,09b

El cromatograma del extracto de camu-camu se muestra en la Figura 16. Se encontraron solo dos antocianinas diferentes en el extracto de cáscara de camu-camu: Cianidina-3-glucósido y Delfinidina-3-glucósido. Estudios previos solo han reportado estos dos tipos de antocianinas en camu-camu y a la fecha no se han encontrado más estructuras (36,37,48). Los tiempos de retención de cada antocianina identificada y sus iones moleculares se resumen en la Tabla 2. Cabe señalar que, en el caso de la Delfinidina-3-glucósido, el pico no se aprecia claramente en el cromatograma debido a su cercanía con los picos adyacentes; sin embargo, mediante un análisis por XIC (ion cromatograma extraído) sí puede observarse. A tiempos de retención mayores a 16 min se observan más picos, indicando posiblemente la presencia de antocianinas sin identificar más complejas.

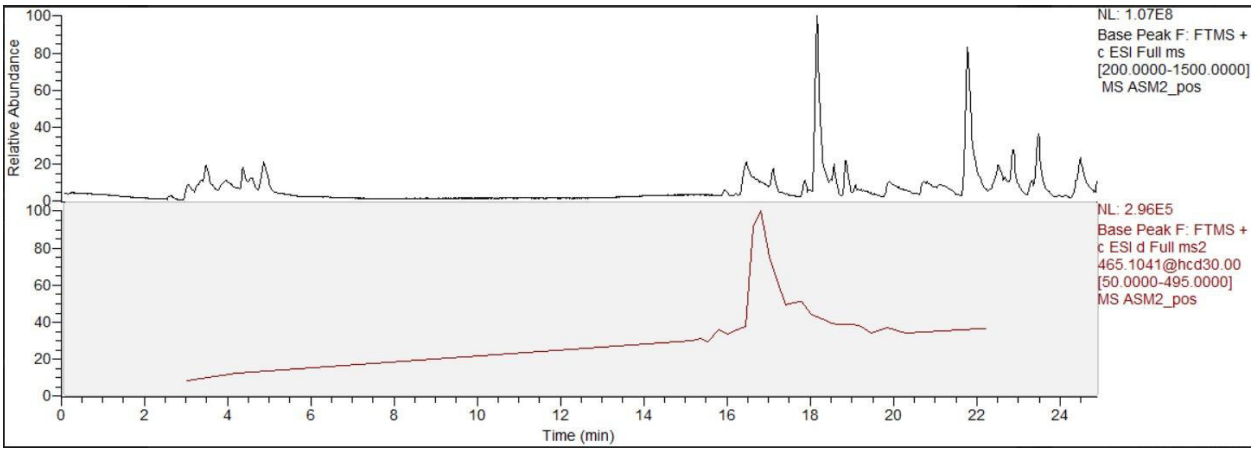


Figura 16. Cromatograma del extracto de ACC.

Tabla 6. Fragmentos iónicos y tiempos de retención de antocianinas identificadas presentes en cáscaras de camu-camu.

N°	Antocianina	Tr (min)	m/z
1	Cianidina-3-glucósido	3,50	449,1087
2	Delfinidina-3-glucósido	16,82	465,1038

iii.2 Copigmentación

En todos los casos, se observó un efecto hipercrómico con el aumento progresivo de la concentración de copigmento. En la Figura 17 se muestran los espectros UV-vis de las ACC copigmentadas con AP, AC, AF y RE.

Los efectos hipercrómicos y batocrómicos de las ACC copigmentadas se muestran resumidas en la Tabla 7 y Tabla 8.

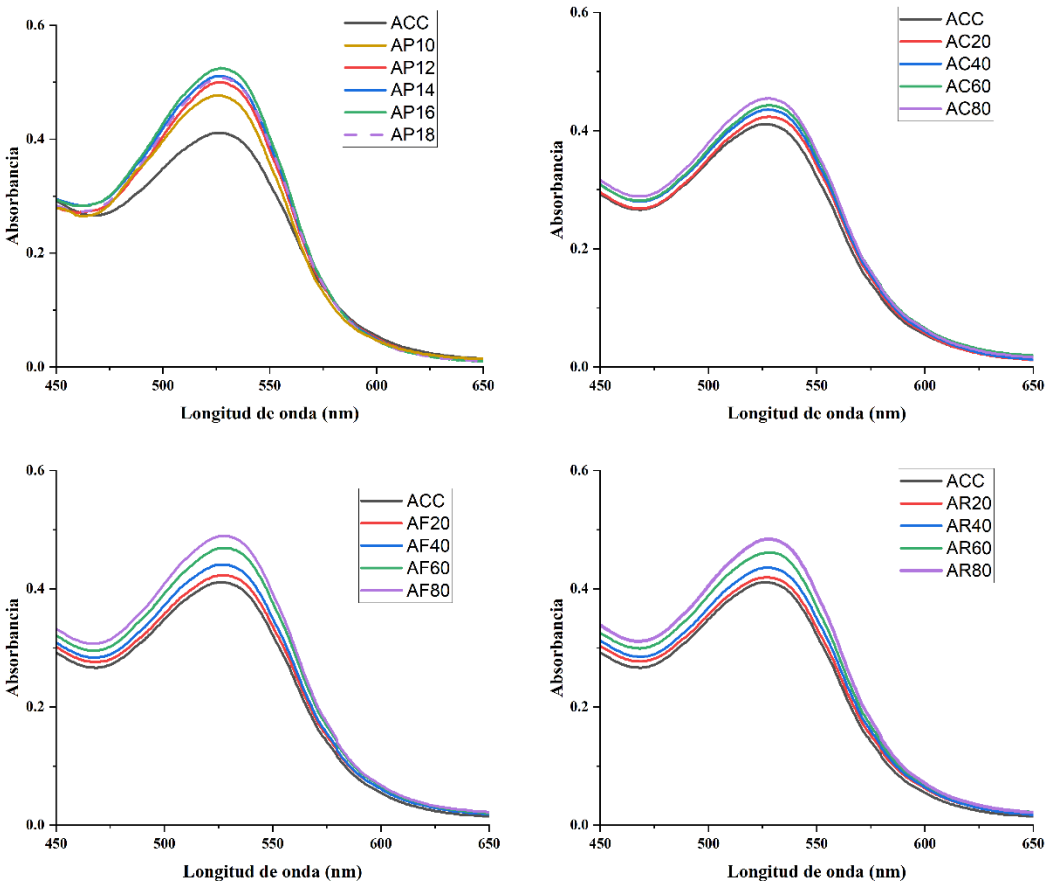


Figura 17. Espectros UV-vis de ACC copigmentadas.

Tabla 7. Efectos hipercrómicos y batocrómicos de ACC copigmentadas con AP.

Muestra	%A	%λ
AP10	19,71	0,13
AP12	20,45	0,19
AP14	22,41	0,19
AP16	25,09	0,19
AP18	22,01	0,19

Tabla 8. Efectos hipercrómicos y batocrómicos de ACC copigmentadas con AC, AF y RE

Muestra	%A	%λ	Muestra	%A	%λ	Muestra	%A	%λ
AC20	3,00	0,38	**AF20**	2,84	0,19	**RE20**	5,76	0,19
AC40	6,41	0,32	**AF40**	8,76	0,19	**RE40**	9,33	0,29
AC60	8,11	0,29	**AF60**	15,17	0,29	**RE60**	13,63	0,38
AC80	9,73	0,32	**AF80**	15,70	0,29	**RE80**	15,25	0,32

Para la copigmentación de ACC, AP16 mostró el mayor efecto hipercrómico (25,09 %), indicando que el AP es un mejor copigmento que RE, AF y AC en la copigmentación de ACC. Sin embargo, presentó el menor efecto batocrómico de todos los copigmentos (0,19 %). Al seguir aumentando la concentración de AP (muestra AP18), se observó una disminución del efecto hipercrómico.

Por otro lado, AF80 y AR80 alcanzaron valores muy similares de efecto hipercrómico (15,70 % y 15,25 %, respectivamente), sin embargo, el efecto batocrómico de AR80 (0,32 %) fue mayor al de AF80 (0,29 %). Esto indica que RE fue el mejor copigmento fenólico en la copigmentación de ACC. Por último, AC80 presentó el menor efecto hipercrómico de todos los copigmentos fenólicos ensayados (9,73 %).

Para la doble copigmentación de ACC se usaron las relaciones de masa óptimas de cada copigmento según lo descrito en la Tabla 9. Los espectros UV-Vis de las muestras doblemente copigmentadas se muestra en la figura 18. Las muestras doblemente copigmentadas resultaron en una disminución del efecto hipercrómico y batocrómico en comparación con la copigmentación simple.

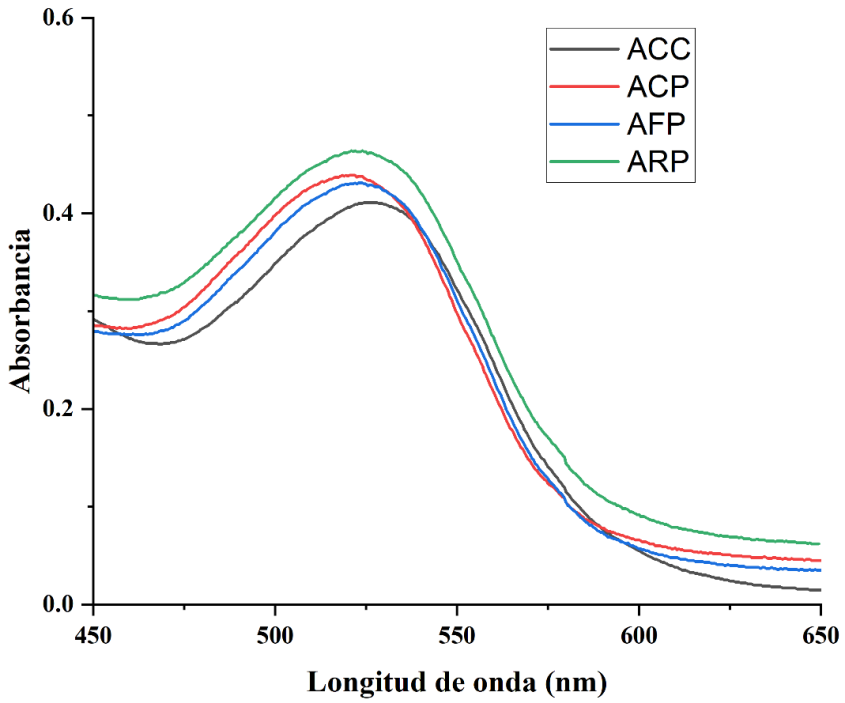


Figura 18. Espectros UV-vis de ACC doblemente copigmentadas.

Tabla 9. Efectos hipercrómicos y batocrómicos de ACC copigmentadas con AC, AF y RE

Muestra	Composición	%A	%λ
ACP	1:80:16 (ACC:AC:AP)	7,38	-1,08
AFP	1:80:16 (ACC:AF:AP)	5,43	-0,44
ARP	1:80:16 (ACC:RE:AP)	12,25	-0,51

iii.3 Espectros FTIR de antocianinas copigmentadas de cáscara de camu-camu

Todas las muestras copigmentadas se compararon con la muestra de antocianinas sin copigmentar y los copigmentos solos.

El espectro FTIR de ACC (Figura 19) mostró bandas características de antocianinas: estiramiento -O-H (3419 cm^{-1}), estiramiento C=C (1627 cm^{-1}), estiramiento C-OH de grupos hidroxilo de anillos aromáticos (1385 cm^{-1}) y estiramientos C-O-C de los anillos aromáticos

entre 1146 cm^{-1} y 1080 cm^{-1}. De manera similar a estudios anteriores, el copigmento AP mostró las siguientes señales: estiramiento -O-H (3419 cm^{-1}), estiramiento C=O correspondiente a un grupo amida (1635 cm^{-1} y 1625 cm^{-1}), flexión -O-H (1385 cm^{-1}) , estiramiento C-O (1147 cm^{-1}) y estiramiento C-N (1119 cm^{-1}) (49). La muestra AP16 mostró una disminución de la intensidad y del número de onda de las señales C-O-C de las ACC. Además, el número de onda de la señal de estiramiento -OH fue de 3444 cm^{-1}. También se observó la disminución de la intensidad de la señal de flexión -OH de AP a 1385 cm^{-1}. Estos cambios indican la formación de enlaces puente de hidrógeno entre las ACC y AP.

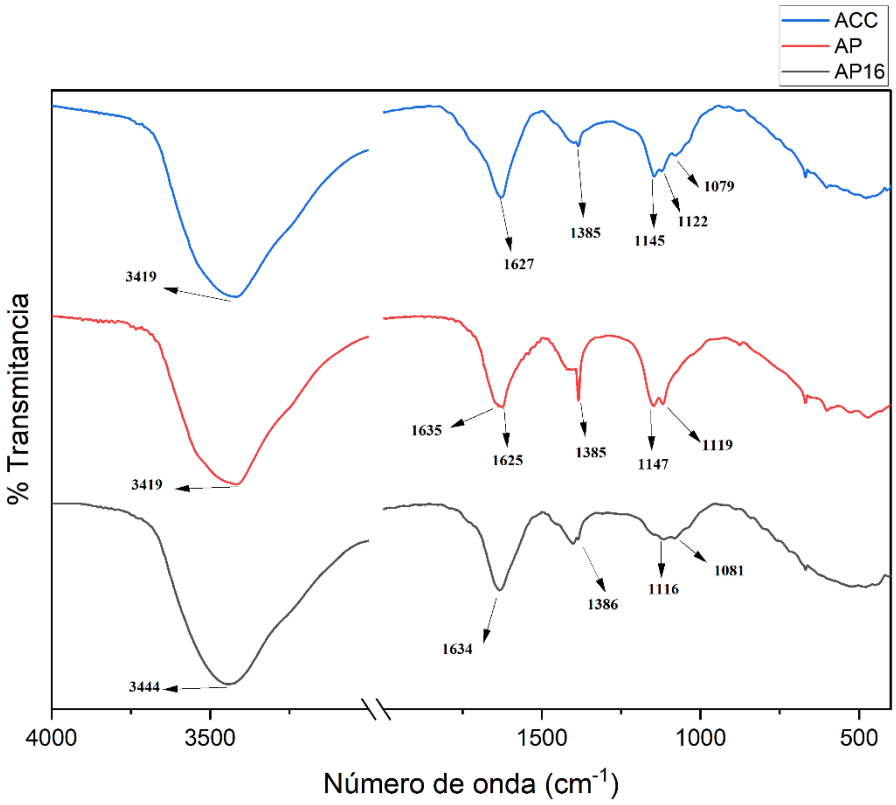


Figura 19. Espectro FTIR de ACC, AP y AP16.

De manera similar a estudios anteriores, el copigmento AC (Figura 20) mostró las siguientes señales características: estiramiento -OH (3454 cm^{-1}), estiramiento C=O (1702 cm^{-1}),

estiramiento C=C del grupo olefina (1633 cm^{-1}), estiramiento C=C del anillo aromático (1450 cm^{-1}, 1415 cm^{-1}y 1220 cm^{-1}) y estiramiento C-OH (1284 cm^{-1})(50,51).

En la muestra AC80, la señal de estiramiento -OH de AC a 3454 cm^{-1}cambió a 3447 cm^{-1}. De la misma manera, la señal de estiramiento C=O de AC a 1702 cm^{-1} cambió a 1674 cm^{-1}. También se observó que las señales de estiramiento C=C a 1415 cm^{-1} de AC cambiaron de número de onda a 1421 cm^{-1} en AC80. Estos cambios son evidencia de formación de enlaces puente de hidrógeno e interacciones π-π entre AC y ACC.

Con respecto a la muestra ACP, la señal de estiramiento -OH cambió a 3444 cm^{-1}. Además, se pudo observar que la señal de estiramiento de C=O de AC desapareció. De igual manera que en AC80, se observó que las señales de estiramiento C=C y C-OH de AC disminuyeron en intensidad y cambiaron de número de onda. Estos cambios indican que las interacciones hidrofóbicas y enlaces puente de hidrógeno entre ACC y AC se ven modificadas al añadir AP.

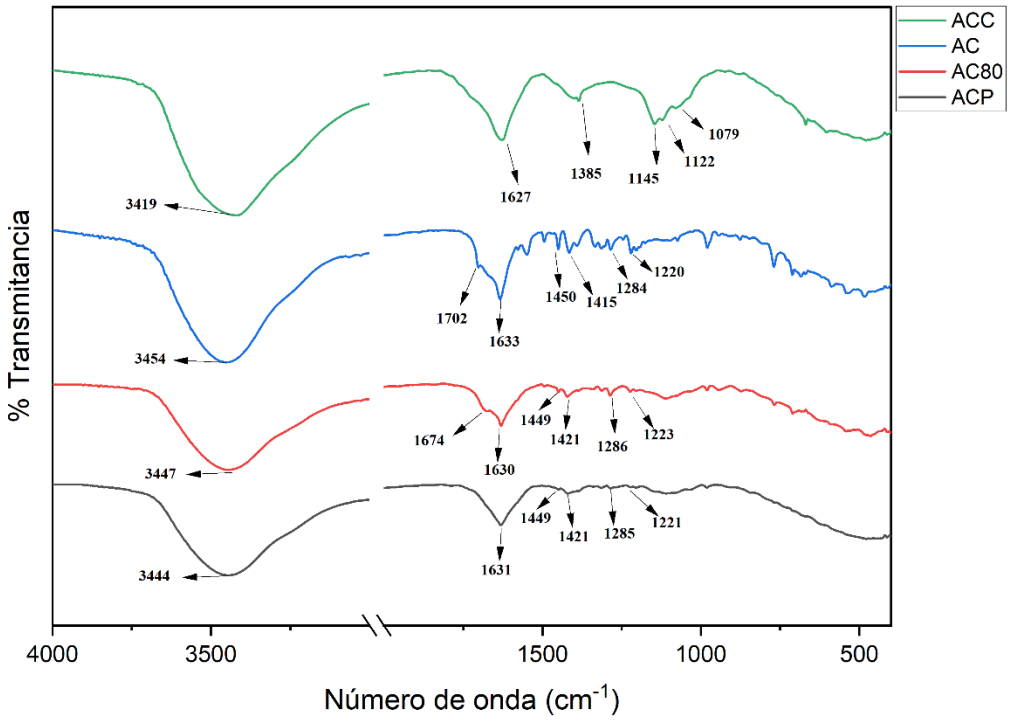


Figura 20. Espectros FTIR de ACC, AC, AC80 y ACP.

De manera similar a estudios anteriores, el copigmento AF (Figura 21) mostró las siguientes señales características: estiramiento -OH (3439 cm^{-1}), estiramiento C=O (1692 cm^{-1}), estiramiento C=C olefina (1623 cm^{-1}), estiramiento C=C aromático (1596 cm^{-1} y 1519 cm^{-1}) y estiramiento y flexión fuera del plano -C-OCH_3 (1204 cm^{-1} y 1031 cm^{-1} respectivamente) (52). En la muestra AF80, la señal de estiramiento -OH de AF80 disminuyó a 3425 cm^{-1} con respecto a AF. La señal C=O a 1692 cm^{-1} de AF ha desaparecido casi por completo. Las señales de flexión -C-OCH3 de AF a 1204 cm^{-1} y 1031 cm^{-1} disminuyeron su intensidad. Las señales C=C de AF a 1692 cm^{-1}, 1596 cm^{-1} y 1519 cm^{-1} cambiaron su número de onda y/o disminuyeron su intensidad. Estos cambios indican la formación de enlaces puente de hidrógeno e interacciones π-π entre las ACC y AF.

La señal de estiramiento -OH de AFP aumentó a 3440 cm^{-1} con respecto a ACC. Además, la señal de estiramiento C=C en AF80 a 1621 cm^{-1} aumentó a 1625 cm^{-1} en AFP. Estos cambios indican que las interacciones hidrofóbicas y enlaces puente de hidrógeno entre ACC y AF se ven modificadas al añadir AP.

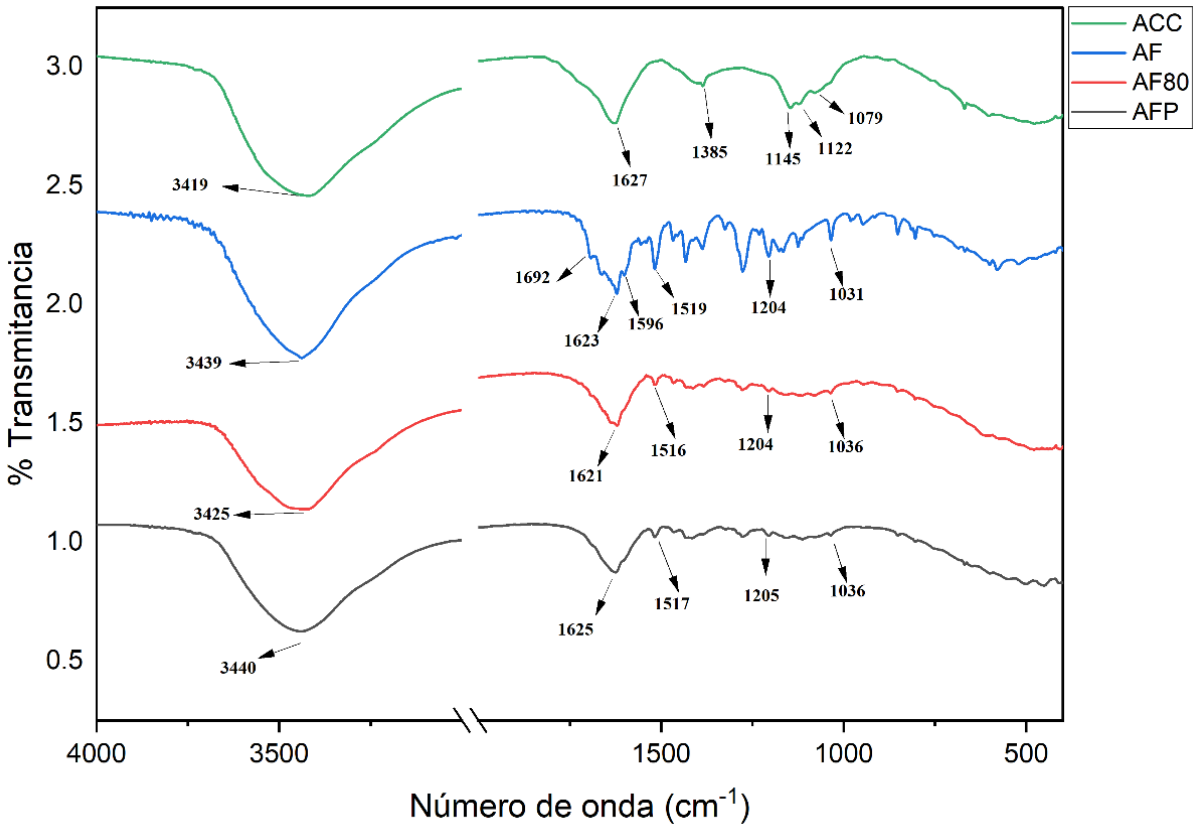


Figura 21. Espectros FTIR de ANT, AP, AF, AF80 y AFP.

De manera similar a estudios anteriores, el copigmento RE (Figura 22) mostró las siguientes señales características: estiramiento -OH (3441 cm^{-1}), estiramiento C=C (1632, 1607, 1591, 1513 y 1464 cm^{-1}), flexión C-OH (1267 cm^{-1}) y estiramiento C-O (1267, 1153, 1105 y 1011) (53). La muestra AR80 mostró una disminución del número de onda de la señal de estiramiento -OH a 3427 cm^{-1} en comparación con la señal -OH de RE. La señal de estiramiento C=C a 1513 cm^{-1} de RE disminuyó de intensidad en AR80. También se observó una nueva señal a aproximadamente 1400 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C=C de RE. Estos cambios son evidencia de formación de enlaces puente de hidrógeno e interacciones π- π entre ACC y RE. |Con respecto a la muestra ARP, la señal de estiramiento -OH de AR80 cambió de número de onda a 3444 cm^{-1}. La señal de estiramiento C-O de AR80 a 1011 cm^{-1} desapareció en ARP. Se

observó que la intensidad de las señales C=C a 1608 y 1592 cm^{-1} disminuyó mucho su intensidad. Estos cambios indican que las interacciones hidrofóbicas y enlaces puente de hidrógeno entre ACC y RE se ven modificadas al añadir AP.

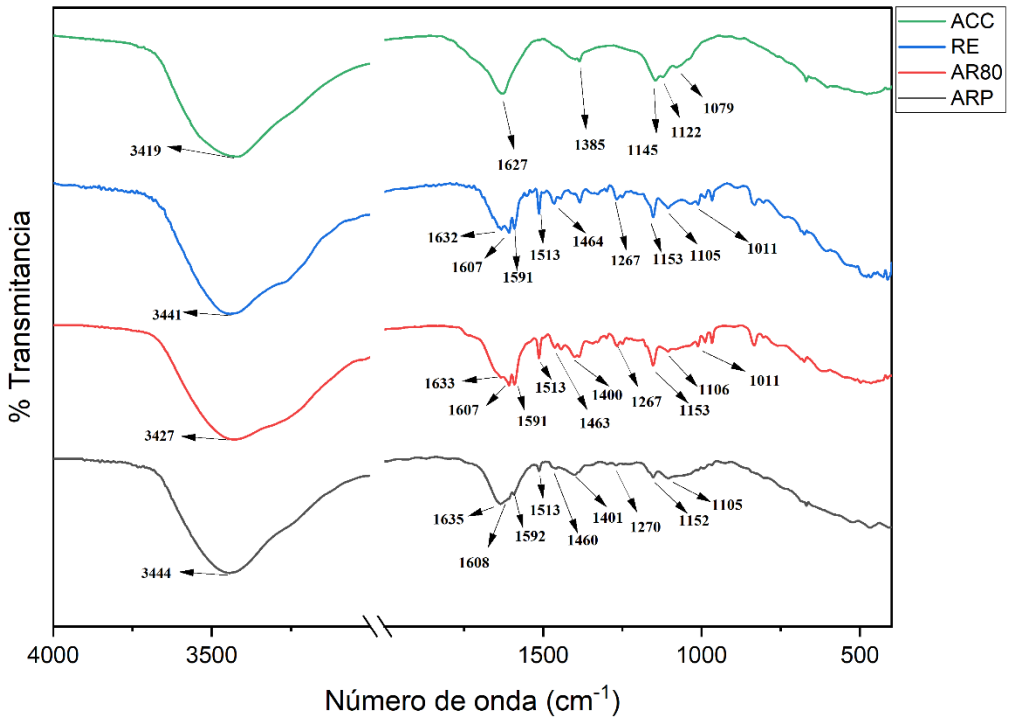


Figura 22. Espectros FTIR de ACC, AP, RE, RE60 y ARP.

iii.4 Análisis termogravimétrico

En la figura 23 se muestra el termograma de ACC. El primer evento de descomposición ACC (30 °C-80 °C) corresponde a la pérdida inicial de agua en la superficie de las antocianinas (porcentaje de pérdida de masa de 7,24 %) (54). El segundo evento de ACC (80 °C-120 °C) mostró una pronunciada pérdida de masa (porcentaje de pérdida de masa de 6,07 %) asignado a escisión de enlaces glucosídicos de las antocianinas (55). El siguiente evento entre 120-220 °C corresponde a la descomposición de las antocianinas, reacciones de desglicosilación restantes y apertura del anillo de las antocianinas, transformándose a ácidos fenólicos y aldehídos, con una pérdida de masa de 27,98 % (56). ACC mostró un tercer evento entre 300

°C-370 °C, correspondiente a la carbonización de subproductos formados por la degradación (55). La Tmax correspondiente a la descomposición de ACC fue 184 °C.

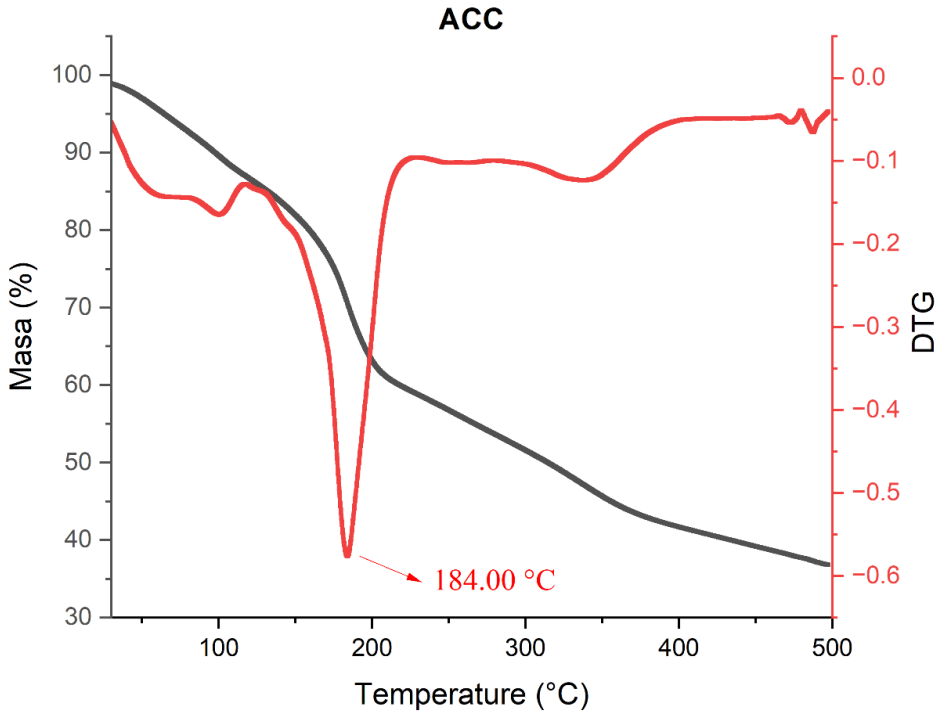


Figura 23. Termograma obtenido de ACC.

En la figura 24 se muestran los termogramas obtenidos de ACC y AP16. AP16 presentó menor pérdida de agua (5,68 %) en comparación con las antocianinas sin copigmentar. Se observó un segundo evento correspondiente a la escisión de enlaces glucosídicos en AP16 entre 90 – 120 ° C con una pérdida de masa de 4,90 %. El evento de descomposición de antocianinas ocurrió desde 120 °C hasta 220 °C (pérdida de masa de 27,98 %). Además, la Tmax obtenida de AP16 fue de 186,41 °C, similar a la obtenida en ACC. Sin embargo, la degradación de antocianinas en AP16 comenzó a 140 °C, mientras que en ACC fue a 120 °C. La masa residual de AP16 fue ligeramente mayor (39,56 %) que las antocianinas sin copigmentar.

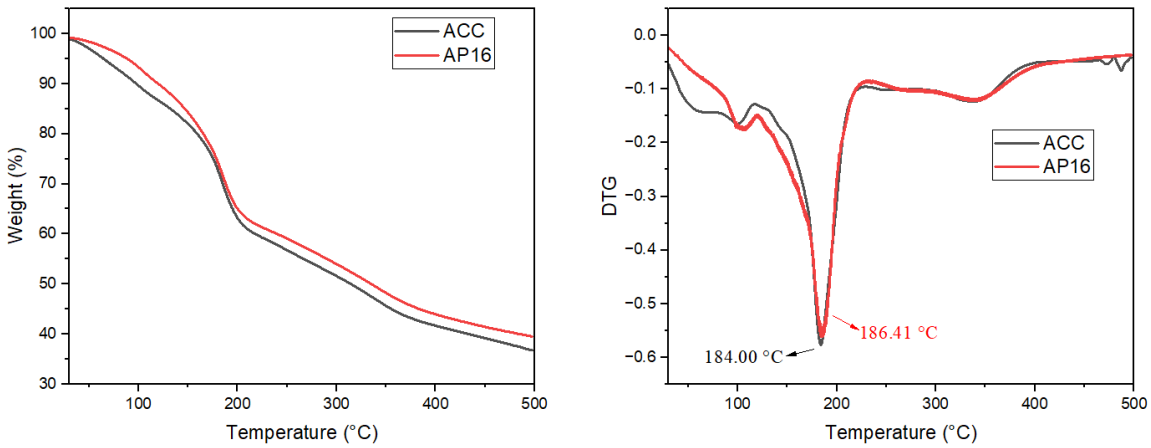


Figura 24. Termograma de ACC y AP16.

En la figura 25 se muestran los termogramas de ACC, AC80 y ACP. AC80 presentó menor pérdida de agua (4,44 %) en comparación con las antocianinas sin copigmentar. Se presentó un nuevo evento de descomposición asignado a la escisión de enlaces glucosídicos de las antocianinas en el rango de 105-170 °C. Se puede notar que la copigmentación con AC favorece el rompimiento de enlaces glucosídicos en las ACC al igual que en la copigmentación con AP. AC80 mostró una descomposición de antocianinas desde 170-220 °C (pérdida de masa de 17,68 %), la cual fue menor que la muestra ACC. Por otro lado, la Tmax obtenida de AC80 fue de 186,34 °C, similar a la obtenida en ACC. Por último, se obtuvo una menor masa residual en AC80 en comparación a las antocianinas sin copigmentar.

La muestra ACP fue similar a AC80. ACP presentó una pérdida de agua (9,71 %) mayor a AC80, indicando posiblemente un debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas al agregar AP. La escisión de enlaces glucosídicos de las antocianinas en ACP sucedió en el rango de 120-170 °C. ACP mostró una descomposición de antocianinas desde 170-220 °C (pérdida de masa de 15,55 %), la cual fue similar a AC80. Por otro lado, la Tmax obtenida de ACCP fue de 184,17 °C, similar a la obtenida en AC80. Por último, la masa residual de ACCCP fue

similar a AC80. Estos resultados sugieren que agregar AP a la copigmentación de antocianinas con AC no produce cambios significativos en la estabilidad térmica.

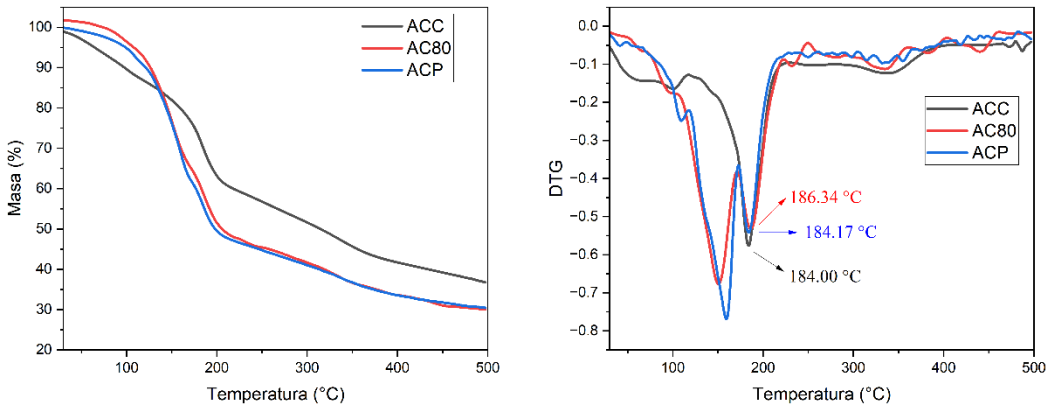


Figura 25. Termogramas de ACC, AC80 y ACP.

En la figura 26 se muestran los termogramas de ACC, AF80 y AFP. AF80 presentó una menor pérdida de agua (3,79 %) en comparación con las antocianinas sin copigmentar. La muestra AF80 mostró un evento asignado a la escisión de enlaces glucosídicos de las antocianinas entre 90-140 °C. También se mostró una descomposición de antocianinas desde 140-220 °C (pérdida de masa de 29,33 %), la cual fue similar a la muestra ACC. Por otro lado, la Tmax obtenida de AF80 fue de 194 °C, indicando una degradación más lenta que ACC. Por último, se obtuvo una masa residual AC80 similar a las antocianinas sin copigmentar. Estos resultados indican que la copigmentación con AF condujo a degradaciones más lentas que las antocianinas sin copigmentar.

La muestra ACP fue similar a AF80, respectivamente. ACP presentó una pérdida de agua (3,79 %) similar a AC80. AFP presentó un evento correspondiente a la escisión de enlaces glucosídicos de las antocianinas entre 90-130 °C, similar a AF80. Además, se observó una descomposición de antocianinas desde 130-210 °C (pérdida de masa de 28,94 %), la cual fue similar a AF80. Por otro lado, la Tmax obtenida de AFP fue de 185,67 °C, similar a la obtenida

en AF80. Esto indica que agregar AP a la copigmentación de ACC con AF no influye de manera significativa en la estabilidad térmica de las antocianinas. Por último, la masa residual de AFP fue similar a AF80.

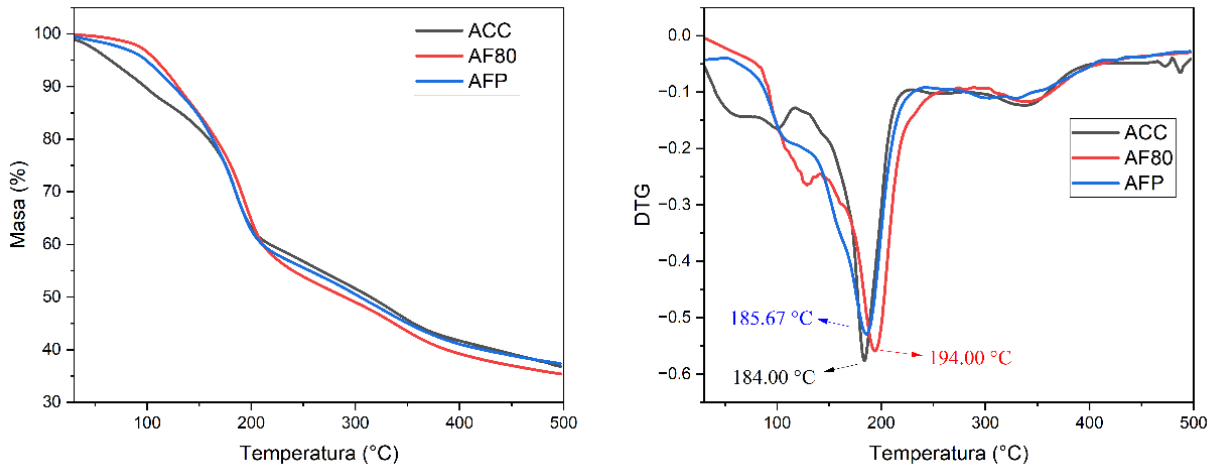


Figura 26. Termogramas de ACC, AF80 y AFP.

En la figura 27 se muestran los termogramas de ACC, RE60 y ARP. La muestra AR80 presentó una menor pérdida de agua (2,73 %) en comparación con las antocianinas sin copigmentar. La muestra AR80 mostró dos eventos asignados a la escisión de enlaces glucosídicos de las antocianinas entre 100-130 °C y 130-155 °C. Además, se observó una descomposición de antocianinas desde 155-220 °C (pérdida de masa de 18,53 %), la cual fue menor a la muestra ACC. Estos resultados indican que RE protegió a las ACC, reflejado en una menor pérdida de masa. Por otro lado, la Tmax obtenida de AR80 fue de 193.33°C, indicando una degradación más lenta que ACC. Estos resultados indican que la copigmentación con RE condujo a degradaciones más lentas que las antocianinas sin copigmentar. Por último, se obtuvo una masa residual en AR80 mayor a las antocianinas sin copigmentar.

La muestra ARP presentó una pérdida de agua (3,05 %) similar a AR80. La escisión de enlaces

glucosídicos de las antocianinas en ARP sucedió en el rango de 90-130 °C. Además, se observó una descomposición de antocianinas desde 130-220° (pérdida de masa de 20,67 %), la cual fue similar a AR80. Por otro lado, la Tmax obtenida de ARP fue de 186,67 °C, la cual fue menor a AR80. Esto indica que agregar AP a la copigmentación de ACC con RE aumenta la velocidad de degradación de las antocianinas. Un nuevo evento apareció en ARP entre 220-260 °C, lo cual puede deberse a un nuevo modo de descomposición de las ACC al formar complejos con AC y AP. Por último, la masa residual de ACP fue similar a AR80.

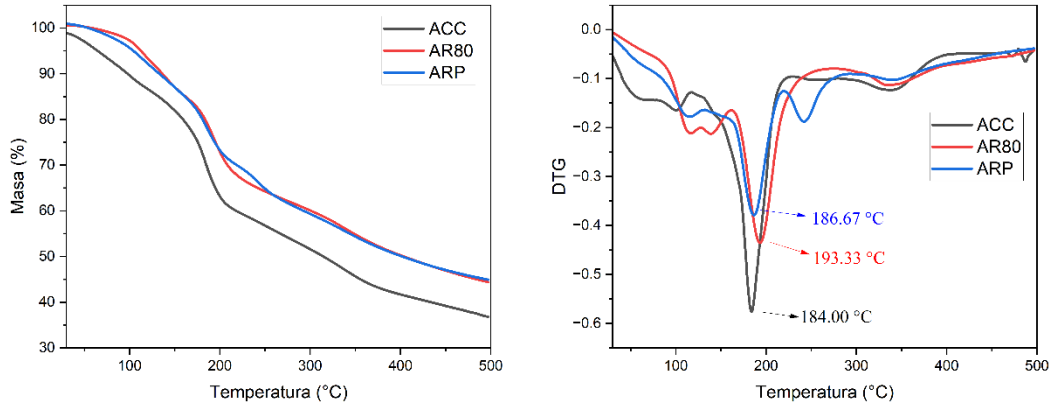


Figura 27. Termogramas de ACC, RE60 y ARP.

En la tabla 10 se resumen todos los datos de la degradación térmica obtenidos de las ACC y las ACC copigmentadas.

Tabla 10. Datos de estabilidad térmica de las ACC y ACC copigmentadas.

Muestra	Rango de descomposición (°C)	Pérdida de masa (%)	Tmax (°C)	Masa remanente a 500 °C
ACC	30-80	7,24	-	36,80
	80-120	6,07	100,28	
	120-220	26,92	184,00	

Tabla 11. Datos de estabilidad térmica de las ACC y ACC copigmentadas (continuación).

Muestra	Rango de descomposición (°C)	Pérdida de masa (%)	Tmax (°C)	Masa remanente a 500 °C
AP16	30-90	5,68	98,78	39,56
	90-120	4,90	102,92	
	120-220	27,98	186,41	
AC80	30-105	4,44	92,49	30,06
	105-170	30,01	150,54	
	170-220	17,68	186,34	
ACP	30-120	9,71	109,44	30,42
	120-170	27,77	159,36	
	170-220	15,55	184,17	
AF80	30-90	3,79	-	35,38
	90-140	10,53	128,75	
	140-220	29,33	194,00	
AFP	30-90	3,79	-	37,37
	90-130	7,15	104,09	
	130-210	28,94	185,67	
AR80	30-100	2,73	-	44,92
	100-130	5,91	116,59	
	130-155	5,19	138,90	
	155-220	18,53	193,33	

Tabla 12. Datos de estabilidad térmica de las ACC y ACC copigmentadas (continuación).

Muestra	Rango de descomposición (°C)	Pérdida de masa (%)	Tmax (°C)	Masa remanente a 500 °C
ARP	30-90	3,05	-	44,42
	90-130	6,45	115,09	
	130-220	20,67	186,67	
	220-260	6,4	241,94	

iii.5 Estabilidad de antocianinas de cáscara de camu-camu a pH 7,4 y 37 °C

Los datos de antocianinas remanentes (AR %) después del tratamiento térmico se muestran en la Figura 28.

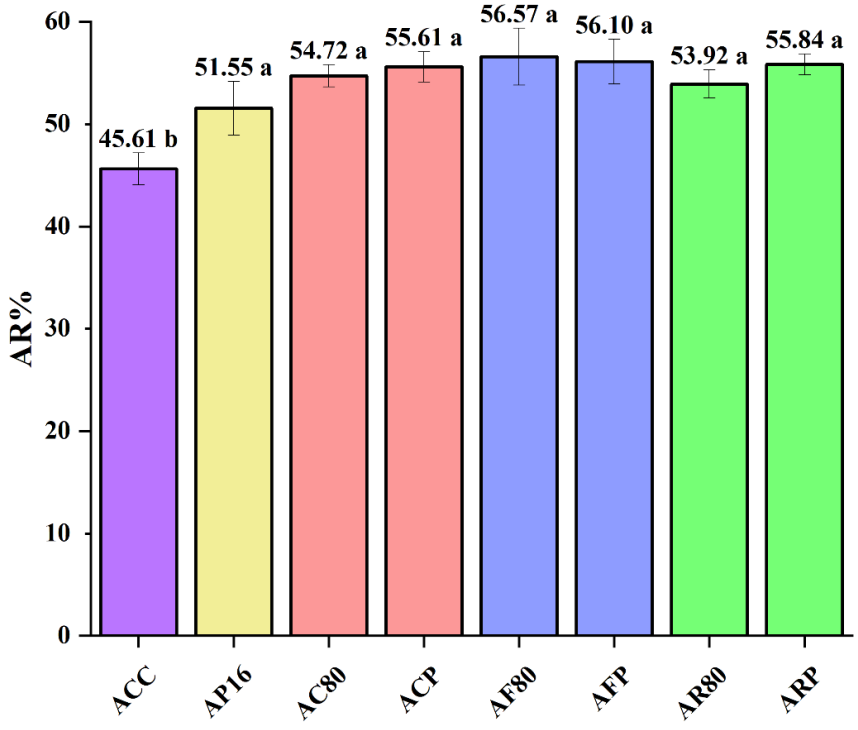


Figura 28. Antocianinas remanentes (AR %) de las ACC copigmentadas después de 24 h a condiciones fisiológicas (pH =7,4 y 37 °C).

La muestra ACC fue la que presentó la mayor degradación después del tratamiento, alcanzando tan solo un 45,61±1,56 % de antocianinas remanentes.

AP16 presentó un 51,55±2,64 % de antocianinas remanentes, el cual fue mayor que el obtenido con la muestra ACC, indicando que la copigmentación con AP favorece la estabilidad de las antocianinas. En cuanto a los copigmentos fenólico AC80, AF80 y AR80, presentaron porcentajes de antocianinas remanentes similares a la muestra AP16 (54,72±1,08 %, 56,57±2,78 % y 53,92±1,36 %, respectivamente). Estos resultados indican que todos los copigmentos favorecieron la protección de las antocianinas en condiciones fisiológicas.

Por otro lado, las muestras doblemente copigmentadas ACP, AFP y ARP presentaron porcentajes de antocianinas remanentes similares a los copigmentos individuales (55,61±1,49 %, 56,10±2,19 % y 55,84±1,02 %, respectivamente). Esto indica que no hubo un efecto sinérgico al combinar los copigmentos fenólicos con AP en ningún caso. De todas maneras, las muestras presentaron mayores valores de antocianinas remanentes que la muestra ACC.

iii.6 Evaluación de estrés oxidativo *in vitro*

En la figura 29 se comparan las TBARS (nmol/g) de copigmentos, ACC y ACC copigmentadas. La muestra ACC mostró un menor valor de TBARS (99,50±13,12) que la muestra EI, indicando que el extracto de cáscara de camu-camu presenta buenas propiedades protectoras ante el estrés oxidativo. Los copigmentos AP, AC, AF y RE presentaron valores de TBARS (54,27±11,45, 98,85±3,94, 77,94±7,76 y 44,80±5,14, respectivamente) menores que la muestra EI, lo cual indica que tienen propiedades protectoras al estrés oxidativo. Además, todas las muestras copigmentadas y doblemente copigmentadas presentaron menores valores de TBARS que la muestra EI. La muestra AP16 presentó mayores niveles de TBARS (97,68±14,14) que el copigmento AP, indicando que combinar ACC con este copigmento

conduce a un empeoramiento de la actividad protectora al estrés oxidativo.

Se destacan las muestras AF80, AR80, ACP y ARP que presentaron menores niveles de TBARS (60,61±10,45, 44,43±3,03, 67,82±11,24 y 40,36±1,46) que la muestra control.

En ningún caso se observó un efecto sinérgico entre ACC y los copigmentos en la actividad protectora al estrés oxidativo.

Muestra	TBARS (nmol/g)
Control	106,50±7,70 b
EI	172,64±14,16 a
ACC + EI	99,50±13,12 b
AP + EI	54,27±11,45 de
AP16 + EI	97,68±14,14 b
AF + EI	77,94±7,76 bcd
AF80 + EI	60,61±10,45 cde
AFP + EI	86,47±8,01 bc
AC + EI	98,85±3,94 b
AC80 + EI	77,80±7,31 bcd
ACP + EI	67,82±11,24 cde
RE+ EI	44,80±5,14 e
AR80 + EI	44,43±3,03 e
ARP + EI	40,36±1,46 e

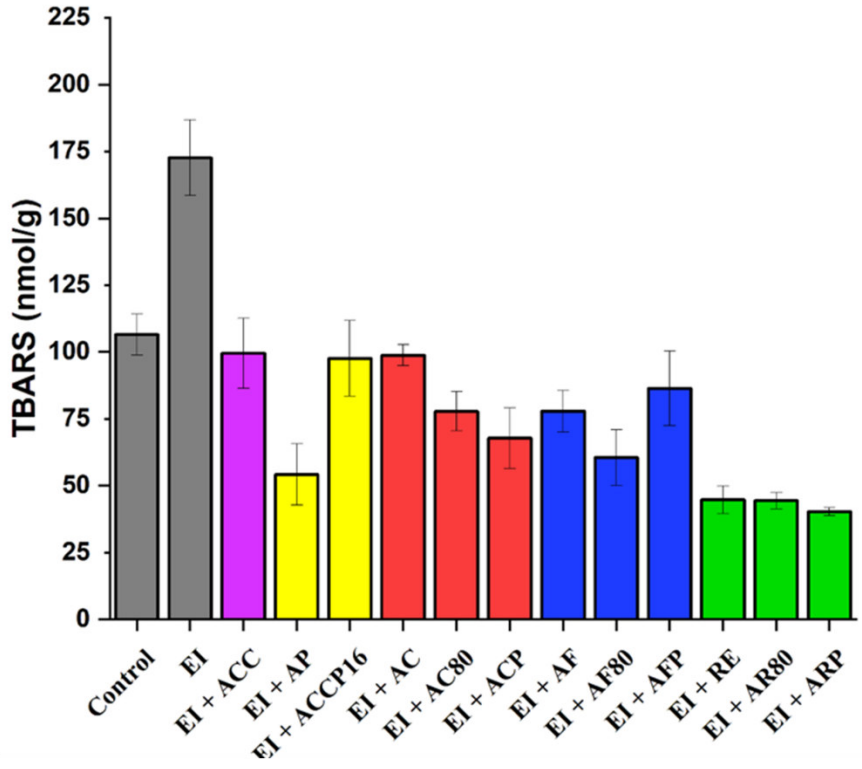


Figura 29. Comparación de TBARS (nmol/g) de copigmentos, ACC y ACC copigmentadas.

iv DISCUSIÓN DE RESULTADOS

iv.1 Extracción de antocianinas de camu-camu

Los parámetros óptimos de extracción de antocianinas de camu-camu fueron: relación masa:solvente 1:15, tiempo:15 min y temperatura: 25 °C, obteniendo un valor de AMT de 342,97 ± 29,07 mg/100 g. Este valor fue mayor que el reportado por Zanatta et al. (36), en

donde encontró entre 30 y 55 mg/100 g de cáscara de camu-camu cultivada en Brasil. Por otro lado, estudios realizados por Conceição et al. (37) cuantificaron 298 y 468 mg/100 g de cáscara de delfinidina-3-glucósido y cianidina-3-glucósido, siendo este último mayor que la cantidad de AMT (expresadas como equivalentes de cianidina-3-glucósido) cuantificadas en el extracto de camu-camu usado en este trabajo. Las diferencias entre las AMT cuantificadas pueden deberse a diversos factores, como las condiciones de extracción o diferentes condiciones de cultivo y crecimiento del material vegetal (4).

iv.2 Copigmentación

Añadir cantidades crecientes de los copigmentos usados condujo a efectos hipercrómicos y batocrómicos, indicando una fuerte interacción de los copigmentos con las ACC.

AP16 mostró el mayor efecto hipercrómico (25,09 %) de todos los copigmentos evaluados, indicando que el AP es un mejor copigmento que RE, AF y AC en la copigmentación de ACC. Esto podría deberse a una mayor cantidad de sitios de interacción en AP, formando más enlaces no covalentes con las ACC en comparación a los copigmentos fenólicos (Figura 30). Sin embargo, la copigmentación con AP presentó el menor efecto batocrómico de todos los copigmentos evaluados con ACC. Esto último es indicativo de poca transferencia de carga entre el polímero y las antocianinas (57,58).

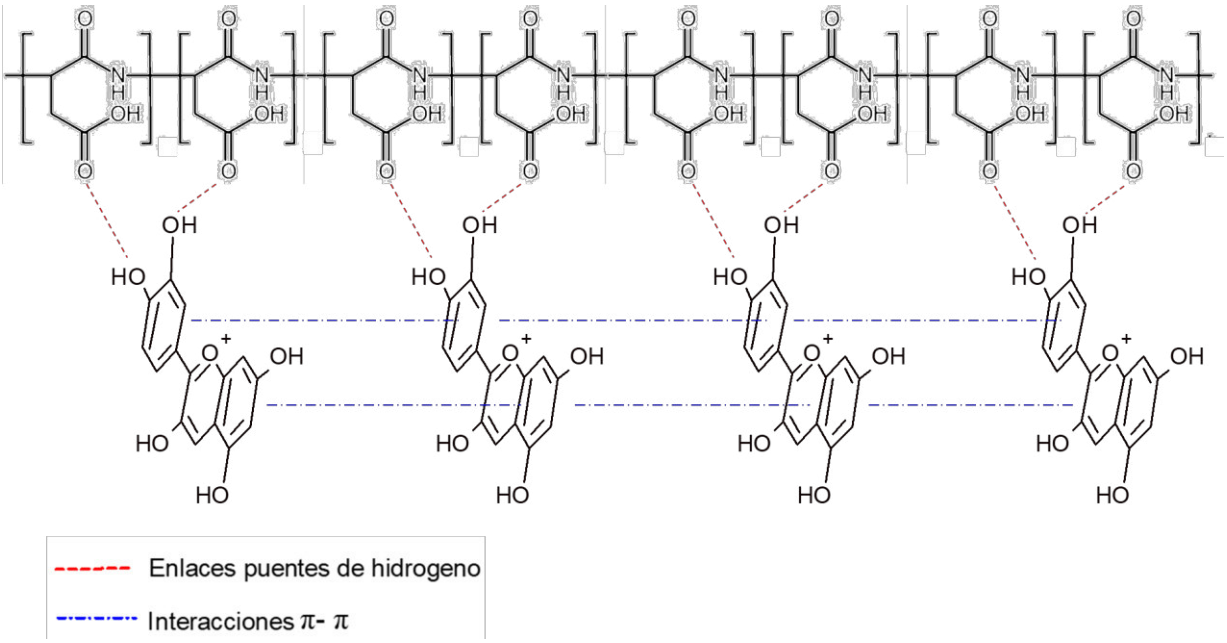
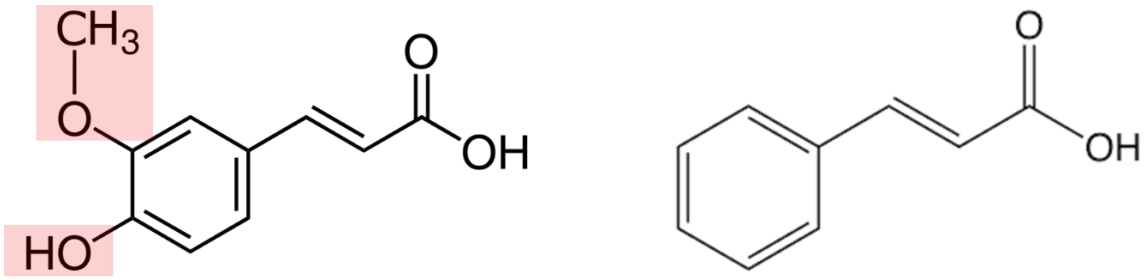


Figura 30. Copigmentación de la antociana con el ácido poliaspartico.

AC80 presentó un menor efecto hipercrómico en comparación a AF80 (9,73 % y 15,70 %, respectivamente). Esto podría deberse al grupo metoxilo presente en AF, el cual actúa como donador de densidad electrónica, permitiendo mayor interacción π-π con las ACC y a un grupo –OH adicional que podría formar más enlaces puente de hidrógeno (Figura 31) (59).



Ácido ferúlico **Ácido cinámico**

Figura 31. Comparación entre las estructuras químicas del ácido ferúlico y el ácido cinámico.

AF80 y AR80 alcanzaron valores muy similares de efecto hipercrómico (15,70 % y 15,25 %, respectivamente) y batocrómico (0,29 % y 0,32 %, respectivamente). El copigmento RE

presenta una gran similitud estructural con las antocianinas (ambas presentan 2 anillos aromáticos unidos por un doble enlace). Esta similitud podría llevar a una buena interacción entre los anillos de RE y las ACC (Figura 32), formando complejos mediante interacciones no covalentes de manera comparable a las formadas con AF (60).

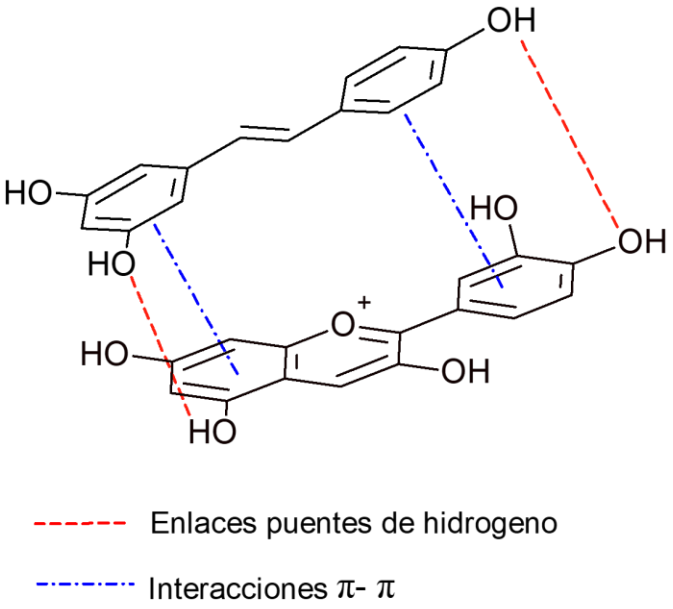


Figura 32. Copigmentación de la antocianina con el resveratrol.

Con respecto a la doble copigmentación, no se observó un efecto sinérgico entre los copigmentos fenólicos y AP. Incluso se observaron efectos hipocrómicos e hipsocrómicos. Estos resultados pueden reflejar una competencia entre la formación de complejos entre las ACC y los dos tipos de copigmentos (fenólicos y polímeros) (61). Esta competencia genera un desordenamiento de las ACC, conduciendo a menores absorbancias.

iv.3 Espectros FTIR de antocianinas copigmentadas de cáscara de camu-camu

Los complejos formados en la copigmentación son estabilizados por enlaces puente de hidrógeno o interacciones π-π entre las antocianinas y los copigmentos. Cambios en el número de onda y/o intensidad de las señales de los grupos funcionales relacionados con la formación

de estas interacciones es una evidencia de la formación de complejos de copigmentación (62,63).

En todas las copigmentaciones evaluadas de la ACC (con los copigmentos AP, AC, AF y RE) se observó la modificación de los números de onda y/o intensidad de señales de los grupos funcionales de los copigmentos involucrados en la formación de los complejos de copigmentación. Se pudo observar que los principales grupos funcionales de los copigmentos involucrados en la formación de los complejos fueron -OH y C=O para enlaces puente de hidrógeno y C=C para interacciones π-π. Con estos resultados se puede comprobar que las ACC forman complejos mediante enlaces puente de hidrógeno e interacciones π- π con AP, AC, AF y RE, tal como se ha evidenciado en estudios previos (23)

En el caso de la doble copigmentación, se observó que las interacciones ya formadas con los copigmentos fenólicos se modificaron al agregar AP. Esto es otra evidencia de la competencia que existe entre AP y los copigmentos fenólicos para formar complejos con las ACC (61).

iv.4 Análisis termogravimétrico

En todos los casos se observó una menor pérdida de agua en los complejos de copigmentación debido a la formación de nuevas interacciones hidrofóbicas entre las ACC y los copigmentos, tal como se dedujo del análisis FTIR. Se mostró un efecto protector de las ACC cuando se copigmentan con AP, aumentando la temperatura a la que inician la deglicosilación de las antocianinas con una diferencia de 10 °C (a partir de 90 °C en lugar de 80 °C cuando están sin copigmentar). Además, la masa residual fue mayor que las antocianinas sin copigmentar. Posiblemente, AP esté actuando como agente encapsulante, rodeando a las ACC y protegiéndolas de la degradación, tal como se ha observado con otros polímeros (61). Además, estudios previos también demostraron la capacidad del ácido aspártico (monómero de AP) en

la protección de antocianinas a elevadas temperaturas, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos (64)

Los copigmentos fenólicos mostraron una mejora en la estabilidad térmica de las ACC, iniciando el proceso de degradación a temperaturas mayores en comparación a las antocianinas sin copigmentar. Esto podría deberse a la estabilización del complejo de copigmentación por interacciones no covalentes, tal como se dedujo del análisis FTIR. La copigmentación con ácidos fenólicos (AC, AF y RE) condujo al favorecimiento de la ruptura de los enlaces glucosídicos de las ACC. Los copigmentos AC y AF presentaron un comportamiento similar en la protección de las ACC al disminuir la velocidad de degradación de las antocianinas, posiblemente debido a que ambos copigmentos son similares estructuralmente y actúan de manera parecida en la estabilización de las antocianinas. Sin embargo, la copigmentación con RE resultó en la menor pérdida de masa y menor velocidad de degradación de las antocianinas en comparación a los demás copigmentos usados. Esto, como ya se ha mencionado antes, podría deberse a su similitud estructural con las antocianinas, favoreciendo la interacción. Además, el copigmento RE presenta más cantidad de grupos -OH capaces de formar interacciones no covalentes con las ACC. Esta mayor cantidad de interacciones en comparación a los otros copigmentos fenólicos podría explicar la mayor estabilidad, tal como ya han sugerido estudios anteriores (60).

La doble copigmentación condujo en general al empeoramiento en la estabilidad de los complejos de copigmentación. Esto era de esperarse de los análisis UV-vis y FTIR, en donde se pudo observar que existen dos fenómenos al agregar AP: 1) Desordenamiento de las ACC y 2) Modificación de las interacciones con los copigmentos fenólicos. Estos dos fenómenos podrían explicar los resultados obtenidos en estabilidad térmica.

iv.5 Estabilidad de antocianinas de cáscara de camu-camu a pH 7,4 y 37 °C

Las ACC presentaron la mayor degradación a condiciones fisiológicas (65) debido al ataque nucleofílico del agua, formando chalconas rápidamente. En cambio, todas las muestras copigmentadas mostraron una mejora en la protección de las ACC debido a interacciones no covalentes entre los copigmentos y las antocianinas. Sorprendentemente, todos los copigmentos mostraron protecciones parecidas. El copigmento AP posee un pKa de 4,5-4,75 (66), por lo que en condiciones fisiológicas (pH=7,4) se encuentra en su forma aniónica. Esta forma aniónica (poliaspartato de sodio) podría estar interactuando con el ion flavilio de las ACC mediante interacciones electrostáticas, favoreciendo la estabilidad de las antocianinas en estas condiciones. Era de esperarse que RE sea el mejor copigmento en comparación a los demás, sin embargo, resultó en efectos protectores similares. Esto podría deberse a la inestabilidad de RE en estas condiciones (67), degradándose rápidamente y desfavoreciendo sus interacciones con las ACC. Como era de esperarse, la doble copigmentación mostró que agregar AP a la copigmentación de las ACC con copigmentos fenólicos no tuvo diferencia significativa por razones antes mencionadas.

iv.6 Evaluación de estrés oxidativo *in vitro*

La solución de ACC mostró una buena capacidad protectora ante el estrés oxidativo, comparable a los copigmentos AC y AF. Estos resultados están de acuerdo con estudios anteriores, ya que se sabe que los extractos de camu-camu presentan buenas propiedades antioxidantes (68).

Todas las muestras copigmentadas condujeron a niveles de TBARS menores que la muestra EI y similares o menores a la muestra control. Sin embargo, no se observó un efecto sinérgico entre las antocianinas y los copigmentos en la capacidad protectora al estrés oxidativo. Esto

podría deberse al mecanismo por el cual los compuestos fenólicos actúan como protectores, el cual consiste la transferencia de un hidrógeno de sus grupos -OH (34). En la copigmentación, estos hidrógenos están ocupados formando enlaces puente de hidrógeno para la formación de los complejos de copigmentación, por lo que existirá una competencia entre formar estas interacciones o ser transferidos para ejercer la actividad protectora. Esta competencia podría ocasionar que no exista un efecto sinérgico entre las ACC y los copigmentos, tal como se vio en los resultados de TBARS (69). Incluso se llegó a observar en el caso de AP16, que la combinación de ACC con AP condujo a una menor actividad protectora con respecto al copigmento AP. Esto podría deberse a el carácter prooxidante de antioxidantes cuando se encuentran en altas concentraciones (70). Las muestras copigmentadas con RE presentaron la mejor protección al estrés oxidativo, lo cual es de esperarse ya que estudios previos han demostrado las propiedades antioxidantes del copigmento RE (71). Esto indica que las ACC copigmentadas con RE forman soluciones de antocianinas estabilizadas mediante enlaces no covalentes y con una notable capacidad para proteger el daño por estrés oxidativo en cerebros, mucho mayor en comparación a los demás copigmentos usados.

v CONCLUSIONES

La copigmentación óptima de las ACC fueron a una relación de masa 1:80 antocianina:copigmento con los copigmentos fenólicos (AC, AF y RE) y 1:16 con AP. El mayor efecto hipercrómico se alcanzó con la muestra AP16 (25,09 %). Los copigmentos fenólicos mostraron efectos hipercrómicos similares (9,73 % - 15,25 %). Todas las copigmentaciones se produjeron por la formación de enlaces puente de hidrógeno entre las ACC y los copigmentos según los análisis FTIR.

El análisis termogravimétrico mostró que todas las ACC copigmentadas presentaron mayor

estabilidad térmica. El copigmento RE en la muestra AR80 mostró la mejor protección de ACC (pérdida de masa por degradación de antocianinas de solo 18,53 % y Tmax de 193,33 °C). La copigmentación resultó en mayor estabilidad de las ACC a condiciones fisiológicas (pH 7,4 y 37 °C), presentando antocianinas remanentes entre 51,55 % y 56,57 % después de 24 h, en comparación a las ACC sin copigmentar (45,61 % de antocianinas remanentes). Todas las soluciones copigmentadas presentaron una buena protección al estrés oxidativo. La copigmentación con RE resultó en los menores valores de TBARS (44,43 nmol/g) en comparación a los demás copigmentos usados.

vi BIBLIOGRAFÍA

1. Sara Evans-Lacko, Elisa Aguzzoli, Sanna Read, Adelina Comas-Herrera NF. World Alzheimer Report 2024: Global changes in attitudes to dementia. 2024.
2. Ionescu-Tucker A, Cotman CW. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease. Neurobiol Aging [Internet]. 2021;107:86–95. Available from: https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.07.014
3. Afzal M, Redha A, AlHasan R. Anthocyanins potentially contribute to defense against Alzheimer's disease. Molecules. 2019;24(23).
4. Enaru B, Drețcanu G, Pop TD, Stănilă A, Diaconeasa Z. Anthocyanins: Factors affecting their stability and degradation. Antioxidants. 2021;10(12).
5. Madnani RS. Alzheimer's disease: a mini-review for the clinician. Front Neurol. 2023;14(June):1–7.
6. Gella A, Durany N. Oxidative stress in Alzheimer disease. 2009;3(1):88–93. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2675154/pdf/cam0301_0088.pdf
7. Kim S, Jung UJ, Kim SR. Role of Oxidative Stress in Blood–Brain Barrier Disruption and

Neurodegenerative Diseases. Antioxidants. 2024;13(12):1–23.

8. MINSA. Alzheimer afecta a más de 200 mil adultos mayores en Perú [Internet]. 2019. Available from: https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/51175-alzheimer-afecta-a-mas-de-200-mil-adultos-mayores-en-peru

9. Breijyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. Molecules. 2020;25(5789):28.

10. Pinedo M, Linares C, Mendoza H, Anguiz R. Plan De Mejoramiento Genetico Del Camu Camu. Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana. Iquitos; 2004.

11. Camu Camu: Un Acercamiento Al Estado Situacional Y Alcances Del Mercado. Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. 2023.

12. Arellano-Acuña E, Rojas-Zavaleta I, Paucar-Menacho L. Camu-camu (Myrciaria dubia): Fruta tropical de excelentes propiedades funcionales que ayudan a mejorar la calidad de vida. Sci Agropecu. 2016;7(4):433–43.

13. Elshafie HS, Camele I, Mohamed AA. A Comprehensive Review on the Biological, Agricultural and Pharmaceutical Properties of Secondary Metabolites Based-Plant Origin. Int J Mol Sci. 2023;24(4).

14. Alara OR, Abdurahman NH, Ukaegbu CI. Extraction of phenolic compounds: A review. Curr Res Food Sci [Internet]. 2021;4(December 2020):200–14. Available from: https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011

15. Chen S, Wang X, Cheng Y, Gao H, Chen X. A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids. Molecules. 2023;28(13):1–27.

16. Wang J, Zhao Y, Sun B, Yang Y, Wang S, Feng Z, et al. The structure of anthocyanins

and the copigmentation by common micromolecular copigments: A review. Food Res Int. 2024;176(December 2023).

17. Tena N, Asuero AG. Up-To-Date Analysis of the Extraction Methods for Anthocyanins: Principles of the Techniques, Optimization, Technical Progress, and Industrial Application. Antioxidants. 2022;11(2).

18. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. J AOAC Int. 2005;88(5):1269–78.

19. da Silva Oliveira JP, de Oliveira RT, Guedes AL, da Costa Oliveira M, Macedo AF. Metabolomic studies of anthocyanins in fruits by means of a liquid chromatography coupled to mass spectrometry workflow. Curr Plant Biol [Internet]. 2022;32(October):100260. Available from: https://doi.org/10.1016/j.cpb.2022.100260

20. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. Int J Anal Chem. 2012;2012:1–40.

21. Pitija K, Nakornriab M, Sriseadka T, Vanavichit A, Wongpornchai S. Anthocyanin content and antioxidant capacity in bran extracts of some Thai black rice varieties. Int J Food Sci Technol. 2013;48(2):300–8.

22. Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández M de L, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. Food Chem [Internet]. 2009;113(4):859–71. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001

23. Trouillas P, Sancho-García JC, De Freitas V, Gierschner J, Otyepka M, Dangles O. Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and

Experiment. Chem Rev. 2016;116(9):4937–82.

24. Freitas V. O mundo colorido das antocianinas. Rev Ciência Elem. 2019;7(2):1–6.

25. Saadatkhah N, Carillo Garcia A, Ackermann S, Leclerc P, Latifi M, Samih S, et al. Experimental methods in chemical engineering: Thermogravimetric analysis—TGA. Can J Chem Eng. 2020;98(1):34–43.

26. Escribano-Bailón MT, Rivas-Gonzalo JC, García-Estévez I. Wine Color Evolution and Stability. In: Red Wine Technology. 2019. p. 195–205.

27. Gençdağ E, Özdemir EE, Demirci K, Görgüç A, Yılmaz FM. Copigmentation and stabilization of anthocyanins using organic molecules and encapsulation techniques. Curr Plant Biol. 2022;29(August 2021).

28. Sharma S, Dua A, Malik A. Polyaspartic acid based superabsorbent polymers. Eur Polym J [Internet]. 2014;59:363–76. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.043

29. Tudorachi N, Chiriac AP. TGA/FTIR/MS study on thermal decomposition of poly(succinimide) and sodium poly(aspartate). Polym Test [Internet]. 2011;30(4):397–407. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.polymertesting.2011.02.007

30. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacogn Rev. 2010;4(8):118–26.

31. Martínez MC, Andriantsitohaina R. Reactive nitrogen species: Molecular mechanisms and potential significance in health and disease. Antioxidants Redox Signal. 2009;11(3):669–702.

32. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. Vol. 94, Archives of Toxicology. 2020. 651–715 p.

33. Kotha RR, Tareq FS, Yildiz E, Luthria DL. Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays. Antioxidants. 2022;11(12).

34. Tumilaar SG, Hardianto A, Dohi H, Kurnia D. A Comprehensive Review of Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants: Overview, Clinical Applications, Global Perspectives, Future Directions, and Mechanisms of Antioxidant Activity of Flavonoid Compounds. J Chem. 2023;2024.

35. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxid Med Cell Longev. 2014;2014.

36. Zanatta CF, Cuevas E, Bobbio FO, Winterhalter P, Mercadante AZ. Determination of anthocyanins from Camu-camu (Myrciaria dubia) by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR. J Agric Food Chem. 2005;53(24):9531–5.

37. Conceição N, Albuquerque BR, Pereira C, Corr CG, Lopes CB, Calhelha RC, et al. By-Products of Camu-Camu [Myrciaria dubia (Kunth) McVaugh] as Promising Sources of Bioactive High Added-Value Food Ingredients : Functionalization of Yogurts. Molecules. 2020;25(70):1–17.

38. Maria LG, Edvan AC, Bala R, Pollyana CC, Antonia RV da S, Sara TMS, et al. Qualitative evaluation and biocompounds present in different parts of camu-camu (Myrciaria dubia) fruit. African J Food Sci. 2017;11(5):124–9.

39. Azevêdo JCS, Borges KC, Genovese MI, Correia RTP, Vattem DA. Neuroprotective effects of dried camu-camu (Myrciaria dubia HBK McVaugh) residue in C. elegans. Food Res Int [Internet]. 2015;73:135–41. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.015

40. Musachio EAS, Pires RG, Fernandes EJ, Andrade S, Meichtry LB, Janner DE, et al. The Amazonian Camu-Camu Fruit Modulates the Development of Drosophila melanogaster and the Neural Function of Adult Flies under Oxidative Stress Conditions. Antioxidants. 2024;13(1):1–18.

41. Sharara MS. Copigmentation Effect of Some Phenolic Acids on Stabilization of Roselle (Hibiscus sabdariffa) Anthocyanin Extract. Am J Food Sci Technol [Internet]. 2017;5(2):45–52. Available from: http://pubs.sciepub.com/ajfst/5/2/3

42. He Y, Wen L, Yu H, Zheng F, Wang Z, Xu X, et al. Effects of high hydrostatic pressure-assisted organic acids on the copigmentation of Vitis amurensis Rupr anthocyanins. Food Chem [Internet]. 2018;268(June):15–26. Available from: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.052

43. Nájera G. Evaluación del efecto de copigmentación de las antocianinas presentes en la coronta de maíz morado en su estabilidad y protección al estrés oxidativo [Internet]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2025. Available from: https://hdl.handle.net/20.500.12672/25729

44. Rodriguez-Lopez AD, Reig M, Mayor L, Ortiz-Climent M, Garcia-Castello EM. Characterization of ionic exchange and macroporous resins for their application on the separation and recovery of chlorogenic acid from the wastewater of artichoke blanching. Sustain. 2021;13(16).

45. Kanha N, Surawang S, Pitchakarn P, Regenstein JM, Laokuldilok T. Copigmentation of cyanidin 3-O-glucoside with phenolics: Thermodynamic data and thermal stability. Food Biosci [Internet]. 2019;30(May):100419. Available from: https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100419

46. Jeong D, Na K. Chondroitin sulfate based nanocomplex for enhancing the stability and activity of anthocyanin. Carbohydr Polym [Internet]. 2012;90(1):507–15. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.072

47. Buege JA, Aust SD. Microsomal Lipid Peroxidation. Methods Enzymol [Internet]. 1978;52:302–10. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687978520326

48. Fracassetti D, Costa C, Moulay L, Tomás-Barberán FA. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (Myrciaria dubia). Food Chem [Internet]. 2013;139(1–4):578–88. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.121

49. Zegarra-Urquia CL, Santiago J, Bumgardner JD, Vega-Baudrit J, Hernández-Escobar CA, Zaragoza-Contreras EA. Synthesis of nanoparticles of the chitosan-poly((α,β)-DL-aspartic acid) polyelectrolite complex as hydrophilic drug carrier. Int J Polym Mater Polym Biomater [Internet]. 2023;72(6):497–506. Available from: https://doi.org/10.1080/00914037.2022.2029440

50. Kalinowska M, Świsłocka R, Lewandowski W. The spectroscopic (FT-IR, FT-Raman and 1H, 13C NMR) and theoretical studies of cinnamic acid and alkali metal cinnamates. J Mol Struct. 2007;834–836(SPEC. ISS.):572–80.

51. Hanai K, Kuwae A, Takai T, Senda H, Kunimoto KK. Comparative vibrational and NMR study of cis-cinnamic acid polymorphs and trans-cinnamic acid. Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc. 2001;57(3):513–9.

52. Sebastian S, Sundaraganesan N, Manoharan S. Molecular structure, spectroscopic studies

and first-order molecular hyperpolarizabilities of ferulic acid by density functional study. Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc. 2009;74(2):312–23.

53. Güder A, Korkmaz H, Gökce H, Alpaslan YB, Alpaslan G. Isolation, characterization, spectroscopic properties and quantum chemical computations of an important phytoalexin resveratrol as antioxidant component from Vitis labrusca L. and their chemical compositions. Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc. 2014;133:378–95.

54. Liudvinaviciute D, Rutkaite R, Bendoraitiene J, Klimaviciute R, Dagys L. Formation and characteristics of alginate and anthocyanin complexes. Int J Biol Macromol [Internet]. 2020;164:726–34. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.157

55. Dong J, Li S, Zhang J, Liu A, Ren J. Thermal degradation of cyanidin-3-O-glucoside: Mechanism and toxicity of products. Food Chem [Internet]. 2022;370(April 2021):131018. Available from: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131018

56. Cai X, Du X, Cui D, Wang X, Yang Z, Zhu G. Improvement of stability of blueberry anthocyanins by carboxymethyl starch/xanthan gum combinations microencapsulation. Food Hydrocoll [Internet]. 2019;91(October 2018):238–45. Available from: https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.034

57. Nave F, Brás NF, Cruz L, Teixeira N, Mateus N, Ramos MJ, et al. Influence of a flavan-3-ol substituent on the affinity of anthocyanins (Pigments) toward vinylcatechin dimers and proanthocyanidins (copigments). J Phys Chem B. 2012;116(48):14089–99.

58. Ferreira Da Silva P, Lima JC, Freitas AA, Shimizu K, Maçanita AL, Quina FH. Charge-transfer complexation as a general phenomenon in the copigmentation of anthocyanins. J Phys Chem A. 2005;109(32):7329–38.

59. Fan L, Wang Y, Xie P, Zhang L, Li Y, Zhou J. Copigmentation effects of phenolics on

color enhancement and stability of blackberry wine residue anthocyanins: Chromaticity, kinetics and structural simulation. Food Chem [Internet]. 2019;275(May 2018):299–308. Available from: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.103

60. Chávez BY, Paz JL, Gonzalez-Paz LA, Alvarado YJ, Contreras JS, Loroño-González MA. Theoretical Study of Cyanidin-Resveratrol Copigmentation by the Functional Density Theory. Molecules. 2024;29(9).

61. Fernandes A, Brás NF, Oliveira J, Mateus N, De Freitas V. Impact of a pectic polysaccharide on oenin copigmentation mechanism. Food Chem [Internet]. 2016;209:17–26. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.018

62. Zhao L, Pan F, Mehmood A, Zhang H, Ur Rehman A, Li J, et al. Improved color stability of anthocyanins in the presence of ascorbic acid with the combination of rosmarinic acid and xanthan gum. Food Chem. 2021;351(January).

63. Tan C, Selig MJ, Abbaspourrad A. Anthocyanin stabilization by chitosan-chondroitin sulfate polyelectrolyte complexation integrating catechin co-pigmentation. Carbohydr Polym [Internet]. 2018;181(May 2017):124–31. Available from: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.034

64. Bingöl A, Türkyılmaz M, Özkan M. Increase in thermal stability of strawberry anthocyanins with amino acid copigmentation. Food Chem. 2022;384(June 2021).

65. Fleschhut J, Kratzer F, Rechkemmer G, Kulling SE. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. Eur J Nutr. 2006;45(1):7–18.

66. Zheng Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S, Dong L, et al. Nanoparticles based on the complex of chitosan and polyaspartic acid sodium salt: Preparation, characterization and the use for 5-fluorouracil delivery. Eur J Pharm Biopharm. 2007;67(3):621–31.

67. Zupančič Š, Lavrič Z, Kristl J. Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. Eur J Pharm Biopharm. 2015;93:196–204.

68. Langley PC, Pergolizzi J V., Taylor R, Ridgway C. Antioxidant and associated capacities of camu camu (Myrciaria dubia): A systematic review. J Altern Complement Med. 2015;21(1):8–14.

69. Bayram I, Decker EA. Underlying mechanisms of synergistic antioxidant interactions during lipid oxidation. Trends Food Sci Technol [Internet]. 2023;133(December 2022):219–30. Available from: https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.02.003

70. Rajashekar CB. Dual Role of Plant Phenolic Compounds as Antioxidants and Prooxidants. Am J Plant Sci. 2023;14(01):15–28.

71. Constantinescu T, Mihis AG. Resveratrol as a privileged molecule with antioxidant activity. Food Chem Adv [Internet]. 2023;3(June):100539. Available from: https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100539