

## ESTUDIO DE EFECTOS QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD DE ANTOCIANINAS Y PIRANOANTOCIANINAS EN SOLUCIÓN ACUOSA MEDIANTE HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS

Araceli Castañeda Ovando<sup>(1)</sup>, José A. Rodríguez<sup>(2)</sup>, Carlos A. Galán Vidal<sup>(2)</sup>, Susana Sánchez Herrera<sup>(1)</sup>

1) Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. Área de Ingeniería Agroindustrial. Carretera Tepatepec-San Juan Tapa, Km. 2. Tepatepec, Hidalgo. C.P. 42660. Tel. y Fax +52(738)7241170.e-mail: ovando\_8@yahoo.com.mx.

2) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Centro de Investigaciones Químicas. Laboratorio de Química Analítica. Carretera Pachuca-Tulancingo, Km. 4.5. Mineral de la Reforma, Hidalgo. C.P. 42184. Tel. +52(771)7172000, ext. 2217.

### INTRODUCCIÓN

Actualmente el estudio de los colorantes naturales es un área activa de investigación debido al creciente interés por sustituir colorantes sintéticos que han reportado efectos tóxicos [1].

Entre los colorantes vegetales más utilizados en el área de alimentos, destacan los carotenoides y las antocianinas, éstas últimas son hidrosolubles y menos estables que los carotenoides. Se obtienen como extractos a partir principalmente de uvas y cerezas. Su principal aplicación es como colorante en alimentos, impartiendo una amplia gama de coloraciones que van del amarillo al azul [2].

En la última década, las piranoantocianinas (moléculas derivadas de las antocianinas) han cobrado mayor interés debido a que son más estables al cambio de pH. El primer estudio reportado acerca de estas moléculas data de 1996, donde se describe una nueva clase de pigmentos detectados en los líquidos filtrados de los vinos tintos [3]. Estas cualidades de las piranoantocianinas conducen a suponer que tienen una posible contribución en el color de los vinos tintos añejados.

Las piranoantocianinas se forman de la reacción entre las antocianinas y moléculas de bajo peso molecular, como el ácido cinámico y sus derivados, el 4-vinilfenol, el ácido pirúvico y los flavonoles; algunas de ellas se han detectado en estudios de vinos tintos como componentes naturales.

La estructura de las piranoantocianinas resulta de la ciclización entre C-4 y el grupo hidroxilo en C-5 del ión flavilio, dando lugar a un cuarto anillo [D], el cual se ha referido como el responsable en la estabilidad de dichos compuestos. Una estructura general de las piranoantocianinas derivadas de la reacción con ácido cinámico se presenta en la Figura 1.

Los mecanismos que se han propuesto para la formación de piranoantocianinas (Figura 1) sugieren una reacción entre las antocianinas del vino con los ácidos hidroxicinámicos libres, como los ácidos cumárico, caféico, ferúlico y sinápico, encontrando que la reacción se puede llevar a cabo rápidamente, dependiendo de las condiciones de almacenaje temperatura y pH [4]. También se ha observado que la concentración de los pigmentos formados (piranoantocianinas) aumenta con el tiempo de almacenamientos de los vinos tintos; para analizar estos compuestos se ha utilizado técnicas como UV-vis, RMN (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C), ESI-MS y LC-ESI-MS [5].

### EXPERIMENTACIÓN

#### Reactivos

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico. El HCl, el  $\text{NaNO}_2$  y el ácido cinámico fueron obtenidos de J. T. Baker (N. J., USA). Las flores de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) fueron adquiridas en establecimientos comerciales. El agua desionizada (18.2 M $\Omega$  cm) utilizada para preparar las soluciones se tomó de un equipo Milli-Q de Millipore (MA, USA).

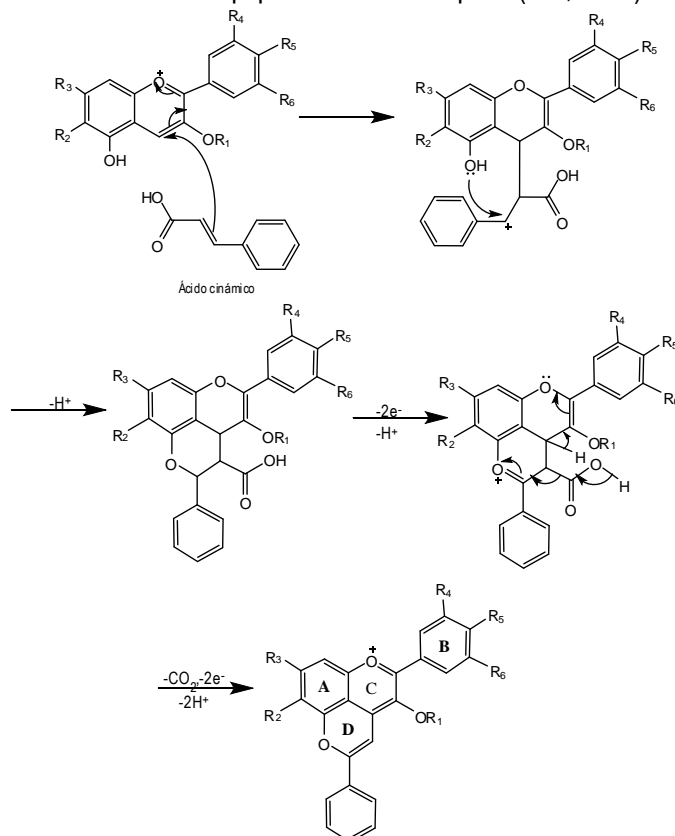


Figura 1. Mecanismo de reacción para la formación de piranoantocianinas a partir de la reacción de antocianinas con ácido cinámico. Donde:  $\text{R}_1$ =sacárido,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_5$  y  $\text{R}_6$ = H, OH o OMe.

### Soluciones

Se preparó una solución patrón de ión nitrito 100 mg L<sup>-1</sup>, pesando la cantidad adecuada de  $\text{NaNO}_2$  y disolviendo en agua desionizada, a partir de la cual se tomaron alícuotas para las diferentes soluciones utilizadas en los experimentos. La solución de ácido cinámico fue preparada en etanol. El amortiguamiento del pH a los diferentes valores experimentales (1, 3 y 5) se llevó a cabo de la siguiente manera: para pH 1 se ajustó con una solución de HCl 1 M, para pH 3 y 5 se preparó una solución amortiguadora Britton-Robinson ( $[\text{H}_3\text{BO}_3]=0.1$  M,  $[\text{H}_3\text{PO}_4]=0.1$  M,  $[\text{AcOH}]=0.1$  M), agregando NaOH hasta obtener los valores requeridos.

### Equipo

La temperatura en los diferentes experimentos fue controlada mediante un holder termostatado y un baño recirculador de LAUDA Brinkmann. Todas las medidas se realizaron utilizando un espectrofotómetro marca Perkin Elmer (MA, USA) modelo Lambda 40 con celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, a una longitud de onda de 515 nm.

### Obtención de la muestra

Para preparar los extractos se pesaron 25.13 g ( $\pm 0.01$  g) de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), previamente secadas a temperatura ambiente, y se agregaron aproximadamente 150 mL de agua desionizada. La mezcla se mantuvo en reposo durante una noche y posteriormente se filtró; la fase líquida se transfirió a un matraz volumétrico y se aforó a un volumen de 250 mL.

El contenido total de antocianinas en el extracto de cada una de las muestras se realizó utilizando el método de pH diferencial [6], para lo cual se prepararon 2 soluciones del extracto, una a pH 1 y la otra a pH 4.5, y se obtuvieron los espectros UV-vis correspondientes en una ventana espectral de 250 a 750 nm. Este experimento se realizó con la finalidad de conocer el contenido de antocianinas monoméricas para agregar en una relación equimolar el ácido cinámico. La solución del extracto se dividió en dos porciones, una de las cuales se le añadió solución etanólica de ácido cinámico hasta alcanzar una relación equimolar ( $[\text{Ácido cinámico}] = 5.8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ). La mezcla se deja reaccionar durante 12 horas en ausencia de luz.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de antocianinas totales en el extracto calculado utilizando el método diferencial fue de 430.61 mg L<sup>-1</sup> (1.37%, n=3).

Por otro lado, se utilizó un diseño experimental de Box–Behnken para investigar el efecto de las variables de pH, tiempo de reacción y concentración de nitrito en la reacción de degradación de ambos extractos (antocianinas y piranoantocianinas), fijando la temperatura de reacción a 60°C y la concentración inicial de antocianinas en aproximadamente 2x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, y así obtener una superficie de respuesta para la reacción de degradación que se llevó a cabo.

El diseño Box-Behnken se forma combinando factoriales 2<sup>k</sup> con diseños de bloques incompletos, la matriz experimental resultante suele ser más eficiente en términos del número de experimentos requerido; los puntos se generan seleccionando dos factores y perturbando en forma completa sus niveles. Esta estrategia se repite para todos los pares de valores posibles.

Para el diseño realizado, cada uno de los factores se toma a 3 niveles diferentes, denominándose alto (+1), medio (0) y bajo (-1). La elección de estos niveles (Tabla 1) se realizó en función a experimentos previos.

Tabla 1. Factores a optimizar con sus respectivos niveles.

Factores	Niveles		
	-1	0	1
pH (u.a.)	1	3	5
[NO <sub>2</sub> ·] (mg L <sup>-1</sup> )	0	5	10
t (min)	0	15	30

Se midió la absorbancia a 515 nm (respuesta) para cada una de las combinaciones obtenidas del diseño experimental. En la Tabla 2 se presentan las combinaciones obtenidas y los valores de absorbancia para cada una de ellas; los experimentos se realizaron aleatoriamente con la finalidad de no introducir errores adicionales.

El ANOVA para las respuestas de los dos extractos (antocianina y piranoantocianina) se muestran en la Tabla 3, los cuales indican que los modelos desarrollados son adecuados, exhibiendo una

medida del desajuste de la ecuación no significativa ( $P=0.05$ ). Para ambos modelos los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) fueron satisfactorios (0.9500 para antocianinas y 0.9835 para piranoantocianinas, respectivamente). Basados en todas las pruebas anteriores, los modelos propuestos se aceptan.

Tabla 2. Combinación de niveles y resultados obtenidos para los mismos.

Factor			Absorbancia (u.a.)	
pH	[NO <sub>2</sub> ]	t	Antocianinas	Piranoantocianinas
1	0	1	0.1129	0.0951
0	0	0	0.2915	0.2898
0	0	0	0.2972	0.2947
1	0	-1	0.3065	0.2306
-1	1	0	0.2348	0.3260
0	1	-1	0.4689	0.4789
1	1	0	0.1130	0.0972
-1	0	1	0.3037	0.3973
1	-1	0	0.1133	0.0950
-1	-1	0	0.9411	0.7665
0	0	0	0.2915	0.3007
-1	0	-1	0.8743	0.7598
0	-1	1	0.3527	0.3556
0	1	1	0.1184	0.1514
0	-1	-1	0.4612	0.4465

Tabla 3. Análisis de varianza para el extracto con antocianinas (A) y el de piranoantocianinas (PIR)

Factor	Contribución (%)	
	A	PIR
pH	39.56	59.13
[NO <sub>2</sub> ]	11.53	7.35
t	20.89	18.33
pH-[NO <sub>2</sub> ]	16.24	9.11
pH-t	5.47	2.25
[NO <sub>2</sub> ]-t	1.55	2.20
Error Residual	4.76	1.62

La predicción de las respuestas para antocianinas (A) y piranoantocianinas (PIR) se calculan por sustitución de los valores de las variables independientes en la ecuación polinomial de segundo orden para cada modelo (Ecuaciones 1 y 2).

$$A = 0.2934 - 0.2135 pH - 0.1166[NO_2^-] - 0.1529t + 0.053 pH^2 + 0.0040[NO_2^-]^2 + 0.0528t^2 + 0.1765 pH[NO_2^-] + 0.0942 pHt - 0.0605[NO_2^-]t \quad (1)$$

$$PIR = 0.2951 - 0.2165 pH - 0.0763[NO_2^-] - 0.1145t + 0.0194 pH^2 + 0.0068[NO_2^-]^2 + 0.0563t^2 + 0.1107 pH[NO_2^-] + 0.0568 pHt - 0.0592[NO_2^-]t \quad (2)$$

De acuerdo a los modelos obtenidos se puede apreciar que en la reacción de degradación, los factores más significativos son el pH y el tiempo, teniendo mayor efecto el primero. Además se puede observar que en el extracto donde posiblemente se formaron las piranoantocianinas el efecto de la concentración de nitrito es menor, lo cual es un indicativo que dichas moléculas son más resistentes a ataques nucleofílicos en comparación con las antocianinas. En la Figura 2 se muestran las superficies de respuesta (Absorbancia (a 515 nm) vs tiempo, pH) para los dos extractos. El perfil de las gráficas difiere debido a la estabilidad que presentan ambos extractos.

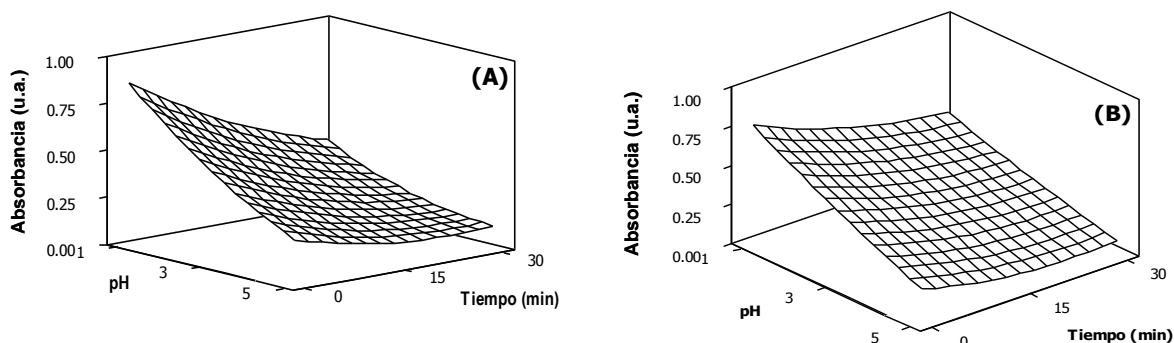


Figura 2. Superficies de respuesta Absorbancia vs tiempo, pH para (A) antocianinas y (B) piranoantocianinas.

En la Figura 3 se presentan los espectros UV-vis para los extractos de antocianinas y piranoantocianinas a los tres valores de pH. En esta Figura se puede observar que no hay cambios significativos en la región visible, sin embargo, en la región UV hay un cambio en el máximo cercano a 285 nm (banda característica de las antocianinas), lo cual es un indicativo que el extracto de piranoantocianinas presenta una mayor conjugación de los dobles enlaces, que se puede traducir en una mayor estabilidad de la molécula.

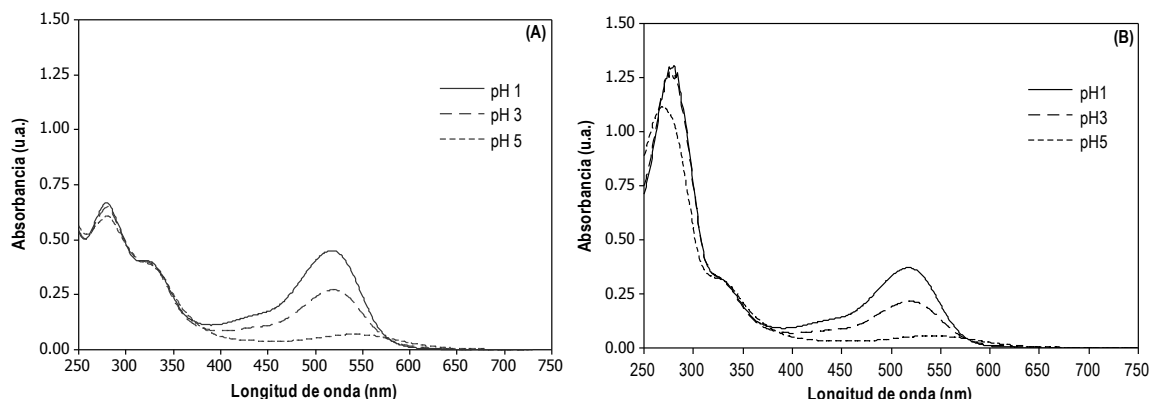


Figura 3. Espectros UV-vis para los extractos de (A) antocianinas y (B) piranoantocianinas, a diferentes valores de pH.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante el método de superficies de respuesta, se tiene que el extracto con piranoantocianinas presenta mayor estabilidad a mayor concentración de nitritos y además, el efecto del tiempo de reacción es menos significativo en comparación con el extracto de antocianinas. Por otro lado, los cambios más significativos en el extracto con piranoantocianinas se presentan en la región del UV ( $\lambda=285$  nm).

Estos experimentos dan un indicio de que al llevar a cabo la reacción entre el extracto antocianínico de las frutas y cereales con ácido cinámico y derivados se puede lograr la estabilización del color, sobre todo para poder aplicarlos en el área de alimentos.

## AGRADECIMIENTOS

ACO agradece al CONACyT la beca otorgada (Número de registro 193400) para realizar estudios doctorales y a la UPFIM por el apoyo recibido.

## REFERENCIAS

- [1] P.-H. Chou, S. Matsui, K. Misaki, T. Matsuda. *Environmental Science & Technology*. **41** [2], 652-657 (2007).
- [2] P. M. Dey, J. B. Harborne. *Plant phenolics Methods*. In *Plant Biochemistry*, Academic Press Limited, England (1993).
- [3] P. J. Cameira dos Santos, J. M. Brillouet, V. Cheynier, & M. Moutounet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **70**, 204-208 (1996).
- [4] M. Schwarz, T.C. Wabnitz, & P. Winterhalter. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51** [12], 3682-3687 (2003).
- [5] M. Schwarz, G. Hofmann, & P. Winterhalter. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52** [3], 498-504 (2004).
- [6] R. E. Wrolstad, R.W. Durst, J. Lee. *Trends in Food Science & Technology*. **16**, 423-428 (2005).