



AUMENTO DE LA ESTABILIDAD DEL COLOR DE EXTRACTOS DE ZARZAMORA MEDIANTE REACCIONES DE CONDENSACIÓN.

Araceli Castañeda-Ovando^{a, *}, Arturo Zúñiga^a, Elizabeth Contreras^a, Anayely Castillo^a,
Judith Jaimez^a

^a *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Química. Laboratorio de Físicoquímica de Alimentos 2. Carr. Pachuca-Tulancingo, Km. 4.5, C.P. 42184. Tel: +52 (771) 7172000 Ext. 2512. Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.*

* ovandoa@uaeh.edu.mx

RESUMEN:

Entre los colorantes naturales más utilizados en el área de alimentos, destacan las antocianinas, las cuales se obtienen como extractos a partir de frutas rojas. Su aplicación como colorantes en alimentos ha sido baja, ya que a pesar de que les imparte una amplia gama de coloraciones, presentan poca estabilidad en solución.

En la última década, las piranoantocianinas (moléculas derivadas de las antocianinas) han cobrado interés debido a que son más estables al cambio de pH; estas moléculas se forman de la reacción entre las antocianinas y moléculas de bajo peso molecular, como el ácido cinámico y sus derivados. Investigaciones recientes han planteado que la estabilidad del color en vinos tintos está relacionada con la formación de este tipo de compuestos.

En el presente trabajo se realizó la extracción de antocianinas de zarzamora, posteriormente se realizó una optimización de la reacción de estas moléculas con ácido cinámico, evaluándose los efectos que tiene la concentración de ácido cinámico, la temperatura, el pH y el tiempo de reacción en los índices de degradación y oscurecimiento de los extractos obtenidos. Los resultados mostraron que los factores más importantes en el % de color polimérico (parámetro relacionado con la formación de piranoantocianinas) son [Antocianina]:[Ácido cinámico] y pH.

ABSTRACT:

Dyes plants most commonly used in the food area include the anthocyanins, which are obtained as extracts from red fruits. Its application as food colorants has been low, as though give a wide color range, presented little solution stability.

In the last decade, the pyranoanthocyanins (molecules derived from the anthocyanins) have gained interest because they are more stable to the pH change; these molecules are formed from the reaction between the anthocyanins and low molecular weight molecules, such as cinnamic acid and its derivatives. Recent investigations have been raised that the stability of the color in red wines is related to the formation of this kind of compounds.

In the present work was done the anthocyanins extraction from black berries, then, was carried out an optimization of the reaction of these molecules with cinnamic acid, evaluating the effects of cinnamic acid concentration, temperature, pH and time reaction time in the degradation and browning rates of the extracts. The results showed that the most important factors in % of polymeric color (parameter associated with the pyranoanthocyanins formation) are [Anthocyanin]: [Cinnamic acid] and pH.

Palabras clave:

Zarzamora, color, piranoantocianinas.



INTRODUCCIÓN

Las antocianinas son los principales compuestos que se encuentran en las frutas rojas, considerándose las responsables de impartir el color a éstas. Las más abundantes en la naturaleza son las del tipo 3-glucósido, tales como la cianidina-3-glucósido, delphinidina-3-glucósido, malvidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido y petunidina-3-glucósido (Castañeda et. al., 2009).

Uno de los alimentos con alto contenido en antocianinas y que ha sido ampliamente estudiado es el vino tinto; cuando este producto es joven, su color se debe principalmente a una unidad monomérica de antocianinas. Sin embargo, los factores intrínsecos, como temperatura, la luz y el pH, pueden afectar las características del mismo, tales como el color, amargor y astringencia. Estos cambios se atribuyen principalmente a la conversión de monómero de antocianinas a la forma más condensada durante la maduración (Corrales et. al., 2008).

Las reacciones derivadas de la condensación de antocianinas con oligómeros son las responsables del cambio de color en vinos tintos de rojo a marrón, y son más estables que los monómeros (Corrales et. al., 2008).

Las reacciones de condensación de antocianinas implican una asociación covalente de estos colorantes con otros flavonoides a través de puentes de etilo o con otras moléculas pequeñas, tales como ácido pirúvico, vinilfenol, ácido glioxílico y ácidos derivados del cinámico (ferúlico, sinápico, p-coumárico, etc.); siendo las piranoantocianinas (Figura 1) el producto obtenido (Schwarz, et. al., 2003).

Estas reacciones se producen de forma espontánea durante el añejamiento de los vinos, pero también pueden ser generados en las soluciones modelo variando la temperatura, el pH y los tiempos de incubación (Corrales et. al., 2008).

Debido a que en la literatura se ha sugerido que las piranoantocianinas formadas durante el añejamiento del vino tinto son las responsables de estabilizar el color, en el presente trabajo se realizó una optimización de la reacción de condensación entre antocianinas presentes en la zarzamora y el ácido cinámico; utilizando un diseño de parámetros de Taguchi; con la finalidad de estabilizar el color de los extractos de zarzamora, permitiendo ampliar su uso como colorante en la industria alimentaria.

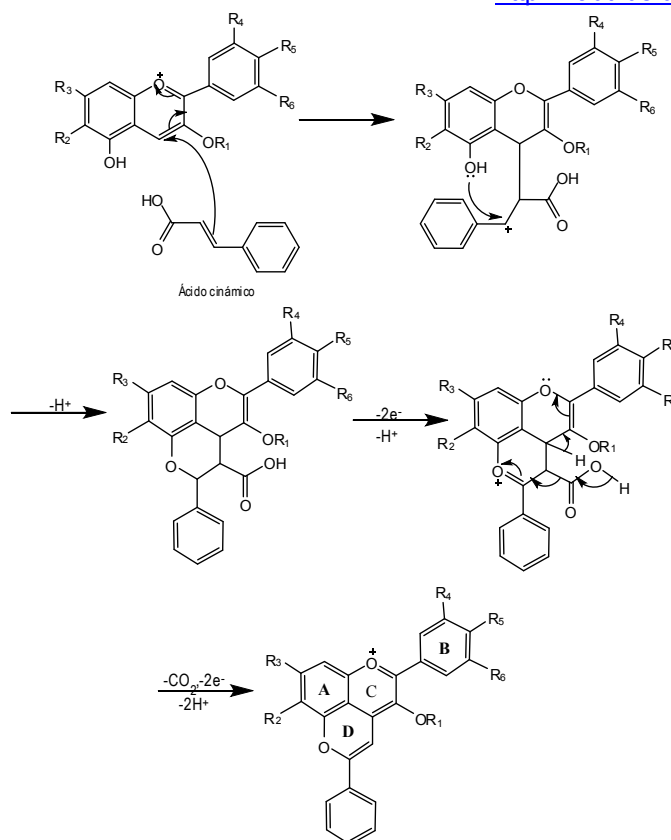


Figura 1. Mecanismo de reacción para la formación de piranoantocianinas a partir de la reacción de antocianinas con ácido cinámico. Donde: R_1 =sacárido, R_2 , R_3 , R_4 , R_5 y R_6 = H, OH o OMe.

METODOLOGÍA

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. El agua desionizada (18.2 MΩ cm) utilizada para preparar las soluciones se tomó de un equipo Milli-Q de Millipore (MA, USA).

Soluciones

Las soluciones utilizadas en la determinación del contenido de antocianinas monoméricas fueron KCl 0.25 mol L⁻¹ (para pH 1) y solución amortiguadora de acetatos (0.4 mol L⁻¹, pH 4.5). Para las determinaciones de los índices de degradación y oscurecimiento se preparó una solución de sulfito ácido a partir del metabisulfito de potasio (K₂S₂O₅).

Obtención del extracto

Se pesaron 500 g de zarzamora y se maceraron con 150 mL de solución etanólica de HCl al 0.2 % (v/v). La mezcla se mantuvo en oscuridad durante una noche y posteriormente fue filtrada y se aforó a un volumen de 500 mL con la solución



etanólica. El filtrado (extracto antocianico) fue almacenado en un envase plástico a 4°C, para ser utilizado en los experimentos siguientes.

Determinación del contenido de antocianinas

El contenido total de antocianinas monoméricas se realizó utilizando el método de pH diferencial (Wrolstad et al., 2005), para lo cual se prepararon dos 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. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Reacciones de condensación

Para la optimización de la reacción de condensación se utilizó un diseño de parámetros de Taguchi, el cual es un método de optimización que puede ser aplicado a cualquier tipo de proceso, en donde la respuesta se encuentra relacionada con los factores de control, de señal y de ruido. La Tabla 1 muestra los factores de control y los niveles seleccionados para cada uno de ellos.

Tabla 1. Niveles de los factores de control elegidos en la optimización de la reacción de condensación.

| | Factores de control | Niveles seleccionados | | |
|---|---|-----------------------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| A | Relación de concentración molar de antocianina: ácido cinámico, [Ant]:[Cin] | 1:50 | 1:100 | 1:150 |
| B | Temperatura (°C) | 20 | 40 | 60 |
| C | pH | 1 | 3 | 5 |
| D | Tiempo de reacción (h) | 1 | 3 | 5 |

El arreglo ortogonal que permite el análisis del número de factores elegido es el $L_9(3^4)$, es decir seleccionar 4 factores de control a 3 niveles cada uno, lo que indica que el número de experiencias mínimo es de 9. La matriz de diseño utilizada en el presente trabajo se encuentra de forma detallada en la Tabla 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para conocer la cantidad de ácido cinámico que se utilizaría en las reacciones de condensación (niveles del factor A) fue necesario calcular el contenido de antocianinas monoméricas en el extracto de zarzamora, para lo cual se tomó como base la Ecuación 1, obtenida por Wrolstad y colaboradores (2005) al hacer el estudio con variedades de muestras en las que incluyeron extractos de diferentes fuentes, expresando el contenido como Cy-3-glc, debido a que es la antocianina más ampliamente distribuida (Francis, 1989). La absorbancia a 700 nm se toma como corrección cuando en la muestra hay sólidos suspendidos o materia coloidal.

$$\text{Antocianinas totales (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{A \times PM \times FD \times 10^3}{\epsilon \times l} \quad (1)$$

donde:

$$A = (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}_1} - (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}_{4.5}} \quad (2)$$

PM= peso molecular de la antocianina más común (Cy-3-glc, PM= 449 g mol⁻¹).

FD= Factor de dilución.

ϵ = coeficiente de absorptividad molar de la antocianina más común (Cy-3-glc, $\epsilon_{510\text{nm}}=26\,900\text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{ L}$ a pH 1.0).

l = longitud de paso óptico.

El contenido de antocianinas monoméricas encontrado en el extracto de zarzamora utilizado durante toda la experimentación fue de 586.2 mgL⁻¹ (1.30x10⁻³ mol L⁻¹), por lo que la concentración de ácido cinámico para los diferentes niveles del factor A fueron: (1) 0.065 mol L⁻¹, (2) 0.13 mol L⁻¹ y (3) 0.195 mol L⁻¹, respectivamente.

Por otro lado, las antocianinas son compuestos que experimentan un amplio número de reacciones de degradación. Su estabilidad es altamente variable dependiendo de su estructura y la composición de la matriz en la que se encuentran (Giusti and Wrolstad, 2001).

Siendo el color un factor muy importante en la aceptación de los productos alimenticios, es necesario contar con parámetros relacionados con la degradación de las antocianinas, los cuales, al modificar la estructura de las mismas (formación de piranoantocianinas), serán afectados positivamente, es decir, permitirán la estabilidad del color.

Entre los métodos para determinar los índices de degradación y de oscurecimiento de las antocianinas se encuentran los de decoloración, que consisten en usar agentes blanqueadores los cuales decoloraran a las antocianinas pero no afectan a otros compuestos coloridos presentes. Uno de los blanqueadores utilizados es el sulfito ácido, que reacciona con las antocianinas monoméricas formando un aducto sulfónico incoloro.

La posición del aducto sulfonato, de acuerdo con Berké y colaboradores (Berké et al., 1998) es el C-4, por lo cual es de esperarse que esta reacción no se lleve a cabo en piranoantocianinas, ya que dicha posición no está disponible, debido a que es donde se encuentra el enlace covalente con otros compuestos de bajo peso molecular. En la Figura 2 se muestra la reacción que se efectúa en la degradación de antocianinas con sulfito ácido.

<http://nautilus.uaz.edu.mx/calimentos>

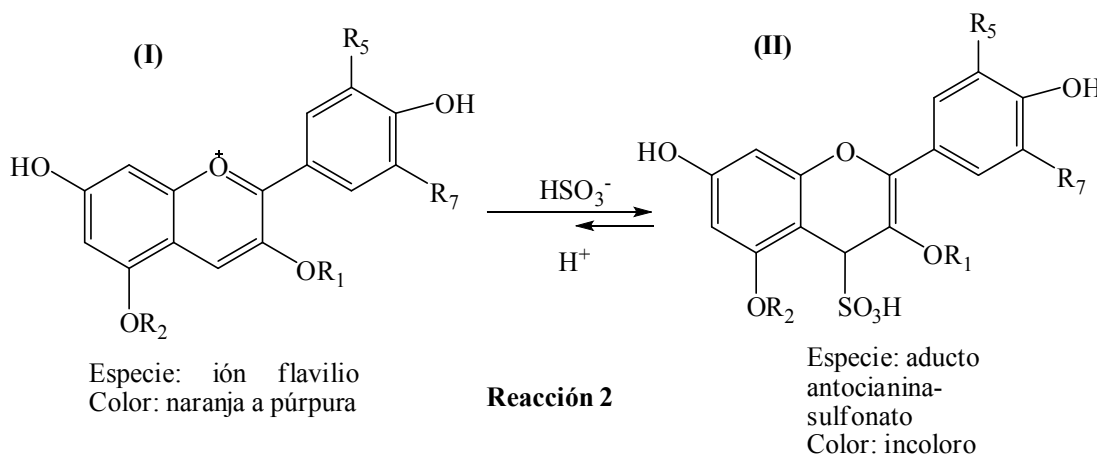
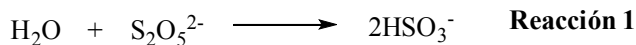


Figura 2. Esquema de reacción de la antocianina con sulfito ácido para la formación del aducto antocianina-sulfonato. **Reacción 1:** hidrólisis del ión persulfato a sulfito ácido. **Reacción 2:** formación del aducto antocianina-sulfonato

Los cálculos para los índices de degradación y oscurecimiento de cada uno de los extractos de piranoantocianinas obtenidos durante la reacción de condensación se realizaron de la siguiente manera:

Densidad del color: se tomaron las lecturas obtenidas de la solución control o blanco (sin sulfito ácido y diluida con agua destilada). La expresión utilizada es:

$$\text{Densidad de color} = (A_{420\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) + (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700\text{nm}}) \times FD \quad (3)$$

Color polimérico: se utiliza la misma expresión mostrada en (3), sólo que tomando las lecturas de la muestra tratada con sulfito ácido.

$$\text{Color polimérico} = (A_{420\text{nm}} - A_{700\text{nm}}) + (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700\text{nm}}) \times FD \quad (4)$$

Esta lectura es debida a la presencia de antocianinas poliméricas, ya que éstas no son susceptibles a la reacción de degradación con el sulfito ácido (piranantocianinas).

Porcentaje de color polimérico: el cálculo se lleva a cabo mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{Color polimérico} = \frac{\text{color polimérico}}{\text{densidad del color}} \times 100 \quad (5)$$

Índice de oscurecimiento: para este cálculo se utilizan los datos obtenidos de la muestra tratada con sulfito ácido mediante la siguiente expresión:

$$\text{Índice de oscurecimiento} = A_{420\text{nm}} \times FD \quad (6)$$

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2, de los cuales sólo se consideró el % de color polimérico como respuesta para el proceso de optimización.



Tabla 2. Matriz de diseño $L_9(3^4)$ y resultados medios ($n=3$) de índices de degradación y oscurecimiento para los extractos obtenidos después de la reacción de condensación de antocianinas con ácido cinámico.

| Experimento | Factores de control | | | | Índices de degradación y oscurecimiento | | | |
|-------------|---------------------|---|---|---|---|------------------|--------------------|--------------------------|
| | A | B | C | D | Densidad de color | Color polimérico | % color polimérico | Índice de oscurecimiento |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 19.08 | 10.94 | 57.34 | 10.41 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 12.67 | 1.08 | 8.52 | 1.11 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 5.05 | 3.73 | 73.86 | 3.42 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 13.43 | 6.52 | 48.55 | 24.61 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 4.75 | 2.11 | 44.42 | 5.30 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 16.07 | 6.33 | 39.39 | 22.96 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 4.58 | 3.10 | 67.69 | 13.55 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 20.21 | 11.76 | 58.19 | 11.88 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 15.35 | 5.25 | 34.20 | 1.72 |

De todos los índices de degradación y oscurecimiento, el parámetro que está más ligado con la estabilidad del color de los extractos obtenidos es el % de color polimérico, ya que los valores mayores de éste, indican que el extracto es más resistente a la presencia de especies nucleofílicas (como el sulfito ácido), lo que los hace más resistentes a componentes nucleófilos que contienen los alimentos, tales como el propio sulfito, nitrito, peróxidos, entre otros.

Debido a ello, se decidió considerar como respuesta en la optimización de la reacción de condensación al % de color polimérico, ya que es el índice más relacionado con la formación de piranoantocianinas, las cuales se ha reportado que estabilizan el color durante el añejamiento de vinos tintos.

El análisis de los datos, considerando únicamente como respuesta al sistema al % de color polimérico, se realizó con el programa Minitab v.15. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Análisis de varianza para la reacción de condensación (obtención de piranoantocianinas). Factor A: [Antocianinas]; [Ácido cinámico]; Factor B: Temperatura de reacción; Factor C: pH y Factor D: Tiempo de reacción.

| Origen de la varianza | gl | Varianza | Contribución (%) |
|-----------------------|----|----------|------------------|
| A | 2 | 1.52 | 5.42 |
| B | 2 | 2.38 | 8.47 |
| C | 2 | 2.38 | 8.47 |
| D | 2 | 4.67 | 16.61 |
| AB | 2 | 6.86 | 24.41 |
| AC | 2 | 6.86 | 24.41 |
| BC | 2 | 3.43 | 12.20 |

En la Tabla 3 se observa que los factores que afectan significativamente a la reacción de condensación son la relación molar de [Antocianina]: [Ácido cinámico]

y el pH, debido a que presentan interacciones muy importantes con los factores restantes (temperatura y tiempo de reacción), aunque sus contribuciones individuales son menores.

En la Figura 3 se presentan las gráficas para la dependencia de los factores, correspondiendo como factor de señal "mayor - mejor".

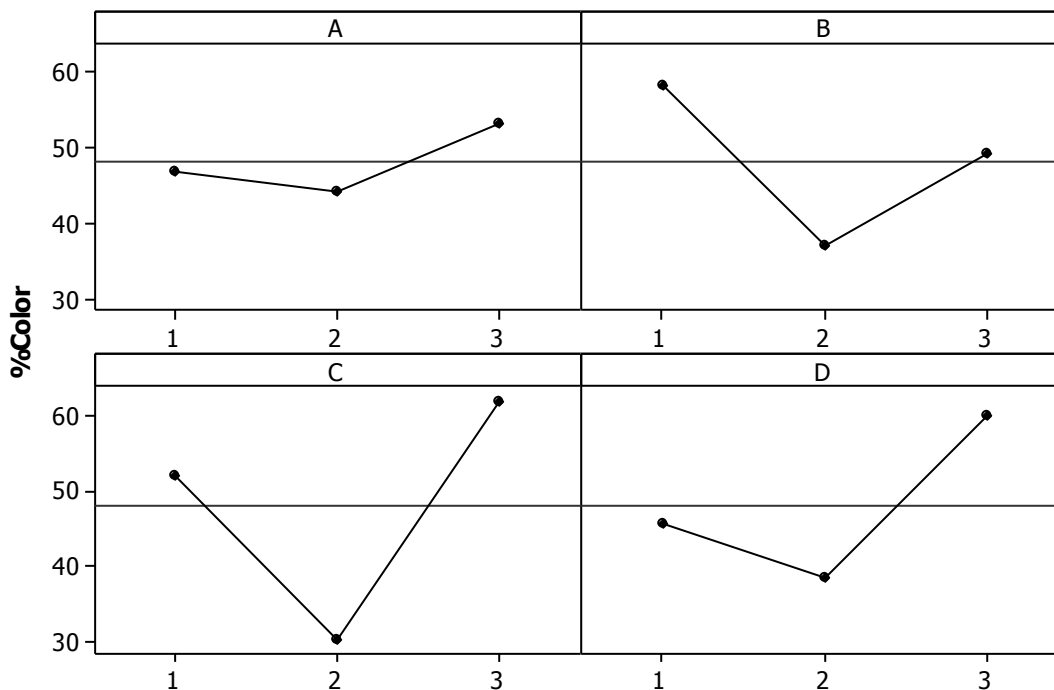


Figura 3. Valores medios de % de color polimérico. Factor A: [Antocianina]:[Ácido cinámico]; Factor B: Temperatura de reacción; Factor C: pH; Factor D: Tiempo de reacción.

A partir de la Figura 3 se elige la combinación de variables que generan la mayor respuesta (% de color polimérico), siendo éstas: [Antocianina]: [Ácido cinámico] 1:150; Temperatura de reacción 20 °C; pH 3 y Tiempo de reacción 5 horas.

Bajo las condiciones óptimas encontradas se están realizando actualmente los experimentos para evaluar la estabilidad del color de extractos de zarzamora, con la finalidad de que en un futuro próximo se puedan utilizar en una amplia gama de alimentos, sin que sufran degradaciones en el color.

CONCLUSIONES

La modificación química de colorantes naturales (antocianinas) por reacciones de condensación con moléculas pequeñas (ácido cinámico) aplicadas ampliamente en el área de alimentos, permite aumentar la estabilidad de estos compuestos, y con ello el uso en un mayor número de productos alimenticios, sin que la degradación del color sea una limitante para ello.



REFERENCIAS

Berké, B., Chéz, C., Vercauteren, J., & Deffieux, G. 1998. Bisulfite addition to anthocyanins: Revisited structures of colourless adducts. *Tetrahedron Letters* 39:5771-5774.

Castañeda, A., Pacheco, M.L., Paéz, M.E., Rodríguez, J.A., Galán, C.A. 2009. Chemical studies of anthocyanins. A Review. *Food Chemistry* 113:859–871.

Corrales, M., Butz, P., Tauscher, B. 2008. Anthocyanin condensation reaction under high hydrostatic pressure. *Food Chemistry* 110:627-635.

Francis, F.J. 1989. Food colorants: Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 28:273-314.

Giusti, M.M.; Wrolstad, R.E. 2001. Unit F1.2.1-13. Anthocyanins. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. In R. E. Wrolstad (Ed.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: John Wiley & Sons.

Schwarz, M., Hillebrand, S., Habben, S., Degenhardt, A., and Winterhalter, P. 2003. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. *Biochemical Engineering Journal* 14:179–189.

Wrolstad, R. E., Durst, R. W., and Lee, J. 2005. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology* 16:423-428.