

Evaluación del contenido de metales y su efecto en la estabilidad de antocianinas extraídas del maíz criollo azul.

Araceli Castañeda Ovando, Carlos Andrés Galán Vidal, Ma. de Lourdes Pacheco Hernández*.

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Centro de Investigaciones Químicas., Laboratorio de Química Analítica. Ciudad Universitaria, Carr. Pachuca-Tulancingo Km. 4.5, Pachuca, Hidalgo, México. C.P. 42076. Tel.: +52 (771) 717 2000 ext. 6785, Fax: +52 (771) 717 2109. e-mail: ovando_8@yahoo.com.mx, galanv@uaeh.edu.mx, mpacheco@uaeh.edu.mx

1. Introducción

Las antocianinas son compuestos altamente inestables y susceptibles a la degradación. Su estabilidad es afectada por el pH, la temperatura de almacenamiento, su propia concentración y estructura, la presencia de enzimas, la luz, el oxígeno y debido a la interacción de diversos flavonoides, proteínas o metales [1]. El interés por estabilizar el color de las antocianinas radica en la diversidad de colores que presentan y los efectos benéficos que implica su consumo en contraparte a los cada día más restringidos colorantes artificiales [1].

La diversidad de colores en las flores fue primeramente explicada por la formación de quelatos entre el metal y la sal flavilio de color rojo de la antocianina [1]. Aunque la complejación con metales es considerada de poco interés en la industria de los alimentos, ya que la contaminación en alimentos por metales es evitada, constituye una alternativa viable de estabilización del color, particularmente si los metales involucrados no implican un riesgo para la salud o incluso pueden ser una fuente de minerales esenciales en la dieta.

Los metales más comunes que se reportan en la formación de complejos con antocianinas son Sn, Cu, Fe, Al, Mg y K [1]. La facilidad para formar los complejos metal-antocianina está relacionada con un rearrreglo *o*-dihidroxi en el anillo B de la estructura de las antocianidinas, por lo que bajo este supuesto sólo la cianidina, delfinidina y petunidina serían capaces de llevar a cabo tal reacción de complejación [2].

En el presente trabajo se cuantifican los metales más comúnmente encontrados en maíz (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, K y Zn [3]), haciendo una correlación con la estabilidad de estos importantes flavonoides mediante espectrofotometría UV/Vis y las constantes de estabilidad de metal-antocianina estimadas en trabajos previos (Tabla 1) [4].

Tabla 1. Constantes de formación metal-cianidina estimadas a partir de los espectros de absorción UV-Vis obtenidos con un detector PDA por electroforesis capilar. Estequiometría 1:1 [4].

Metal	log K
Ni(II)	3.8
Fe(III)	4.0
Cu(II)	5.0
Ca(II)	5.3
Fe(II)	5.5

Concentraciones iniciales de 5×10^{-4} y 2.95×10^{-6} M del metal y antocianina respectivamente.

2. Experimentación

2.1 Preparación de Soluciones.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico, el agua utilizada se desionizó mediante un equipo Milli-Q ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). En el caso de las soluciones de iones metálicos, se prepararon a partir de estándares de estos elementos para absorción atómica.

2.2 Equipo.

La cuantificación de los metales se llevó a cabo en un espectrofotómetro de absorción atómica, Spectra 800 de Varian. Los espectros UV/Vis se obtuvieron en un espectrofotómetro Lambda 40 de Perkin Elmer con celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico a una velocidad de barrido de 60 nm/min.

2.3 Métodos.

2.3.1 Digestión de la muestra.

Se pesaron 0.2000 g de muestra seca y se le realizó un tratamiento de mineralización agregando 10 mL de agua regia y calentando en una parrilla de durante hora y media, manteniendo un volumen constante con agua desionizada. Después de este tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente, se filtra y el filtrado se recoge en un matraz de 25 mL, aforando finalmente con agua desionizada. El tratamiento se realiza por triplicado para cada una de las muestras (maíz molido y pericarpio), además de realizar el mismo procedimiento para una solución blanco.

2.3.2 Obtención del extracto.

a) Hidrolizado

Se realizó la extracción de los pigmentos utilizando HCl en metanol al 50%, medio que permite la hidrólisis de las antocianinas en sus respectivos aglicones. Posteriormente, este extracto fue purificado mediante cartuchos C₁₈ y finalmente liofilizado.

b) No hidrolizado

Para evitar la hidrólisis de las antocianinas, éstas fueron extraídas con un medio más suave (HCl al 2% en MeOH). Este extracto también fue purificado mediante cartuchos C₁₈ para posteriormente ser liofilizado.

2.3.3 Condiciones para el análisis por espectroscopia de absorción atómica (EAA).

Se prepararon estándares para cada uno de los elementos (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, K y Zn) en matriz nítrica (3% de HNO₃). Todas las determinaciones se llevaron a cabo por flama utilizando llama de aire-acetileno.

2.3.4 Condiciones para el análisis por espectroscopia de UV/Vis.

Se prepararon soluciones que contenían 10 mg de extracto (hidrolizado y no hidrolizado), se aforaron a 25 mL con agua desionizada y se filtraron para eliminar sólidos no disueltos. Las concentraciones de antocianidina y antocianina aproximadas son de 1.82×10^{-6} y 2.26×10^{-5} mol L⁻¹ (cálculo realizado por el método de “*equivalentes de estándar interno*”), respectivamente. Después de obtener los espectros, se tomaron 2 mL de estas soluciones y se mezclaron con cada una de las soluciones de Ca, Mg, Cu y Zn, según se muestra en la Tabla 2, obteniéndose de cada una de las soluciones los espectros correspondientes.

3 Resultados y discusión

3.1 Contenido total de metales en las muestras.

En la Tabla 3 se presentan los parámetros de las curvas de calibración obtenidas para cada uno de los elementos analizados.

Los resultados del análisis de metales en las muestras de maíz (molido y pericarpio) se muestran en la Tabla 4. Para los análisis de Ca, Mg y K fue necesario hacer diluciones 1:10 de las soluciones. De acuerdo a los resultados presentados en dicha tabla se puede apreciar que Ca, Cu, Mg y Zn se presentan en mayor concentración en el pericarpio; la cual al ser la parte del grano de

maíz en donde están contenidas las antocianinas en mayor cantidad, podría significar que estos metales causarían una estabilidad en el color de dichos pigmentos en solución.

Tabla 2. Condiciones utilizadas en espectroscopia UV/Vis.

Solución	Ión metálico	Solución	Ión metálico
<i>Extracto hidrolizado</i>		<i>Extracto no hidrolizado</i>	
1	---	6	---
2	Ca (II)	7	Ca (II)
3	Cu (II)	8	Cu (II)
4	Mg (II)	9	Mg (II)
5	Zn (II)	10	Zn (II)

*Las concentraciones de los iones metálicos (en mol L⁻¹) en las soluciones finales fueron: Ca (II) 1.67x10⁻⁴, Cu (II) 1.05x10⁻⁴, Mg (II) 2.73x10⁻⁵ y Zn (II) 1.02x10⁻⁴.

Tabla 3. Parámetros para las curvas de calibración obtenidas del análisis por EAA. LD=límite de detección.

Elemento	Ecuación de la curva de calibración	r ²	LD (mg L ⁻¹)
Ca	A= 0.0594(±0.0020)+ 0.0025(±0.0011)	0.9945	0.087
Cu	A= 0.0171(±0.0004)+ 0.0003(±0.0005)	0.9972	0.127
Fe	A= 0.0027(±0.0001)+ 0.0006(±0.0002)	0.9956	0.411
Mg	A= 0.8382(±0.0214)+ 0.0077(±0.0042)	0.9961	0.034
Mn	A= 0.0170(±0.0007)+ 0.0004(±0.0007)	0.9929	0.210
Ni	A= 0.0306(±0.0011)+ 0.0001(±0.0015)	0.9930	0.242
K	A= 0.3583(±0.0070)+ 0.0065(±0.0016)	0.9977	0.025
Zn	A= 0.1721(±0.0038)+ 0.0019(±0.0009)	0.9976	0.027

De acuerdo a los resultados, de estos cuatro metales el Ca se presenta en aproximadamente 5 veces más en el pericarpio que en el maíz molido, y de acuerdo a los resultados previos que se tienen acerca de la estimación de constantes de complejación metal- antocianina, el Ca (II) es uno de los metales con uno de los valores mayores de K (10^{5.3}, Tabla 1). Estos resultados son de gran relevancia, dado que en el proceso de nixtamalización no se pierde la coloración del maíz, a pesar de las condiciones básicas (tratamiento con Ca(OH)₂), lo cual podría atribuirse precisamente a la presencia del Ca, el cual permite la estabilidad del color.

Tabla 4. Contenido medio de metales en maíz molido y pericarpio. Entre paréntesis se muestra el %DER, n=3. Los LD en base seca (mg g⁻¹), considerando 0.2000 g de muestra son: Ca 4.35x10⁻⁴, Cu 6.35x10⁻⁴, Fe 0.051, Mg 1.70x10⁻⁴, Mn 1.05x10⁻³, Ni 1.21x10⁻³, K 1.25x10⁻⁴, Zn 1.35x10⁻⁴ (mg g⁻¹).

Elemento	Contenido (mg L ⁻¹)		Contenido (mg g ⁻¹)	
	Maíz molido	Pericarpio	Maíz molido	Pericarpio
Ca	3.09 (1.84)	14.86 (2.47)	0.363 (2.47)	1.616 (3.11)
Cu	<LD	0.53 (3.37)	<LD	0.058 (4.95)
Fe	<LD	<LD	<LD	<LD
Mg	5.83 (3.85)	16.63 (1.93)	0.681 (1.28)	1.811 (4.09)
Mn	<LD	<LD	<LD	<LD
Ni	<LD	<LD	<LD	<LD
K	30.85 (4.19)	11.98 (4.72)	3.590 (4.77)	1.302 (3.16)
Zn	0.14 (4.96)	0.30 (2.07)	0.016 (4.53)	0.033 (2.68)

El Cu también es un caso especial para la estabilización de las antocianinas, debido a que como se ha reportado previamente [1], es uno de los iones metálicos que forman complejos con las antocianinas, estabilizando el color de éstas. Para los estudios que se realizaron, se puede observar que este metal se encuentra por debajo del LD del análisis ($6.35 \times 10^{-4} \text{ mg g}^{-1}$) en el maíz molido; sin embargo, en el pericarpio se encuentra en una concentración de 0.058 mg g^{-1} ($8.34 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), cantidad que puede ser suficiente para estabilizar las antocianinas contenidas en el maíz. En el caso del Mg y del Zn, los cuales se encuentran 3 y 2 veces en mayor concentración en el pericarpio que en el maíz molido, aunque en los estudios previos no se consideraron estos iones metálicos, si se tienen referencias acerca de la formación de complejos con antocianinas [1,2], por lo que en el estudio por espectroscopia UV/Vis se tomarán en cuenta.

3.2 Comportamiento de los extractos con la presencia de iones metálicos.

En la Figura 1 se muestran los espectros UV/Vis de los extractos antocianínicos (hidrolizado y no hidrolizado). A pesar de que se pesaron las mismas cantidades del extracto (10 mg), en los espectros se observa que para el extracto hidrolizado prácticamente desaparece el máximo entre 500 y 550 nm, responsable de la coloración roja en las antocianinas. Asimismo, en 285 nm aproximadamente se presenta otro abatimiento en la señal (otra de las bandas características para las antocianinas).

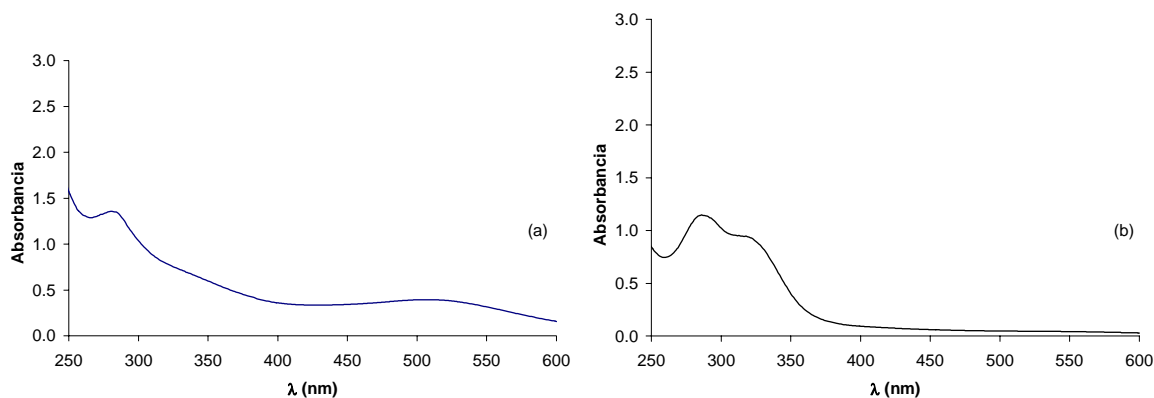


Figura 1. Espectros de UV/Vis para los extractos, (a) no hidrolizado ($[\text{Antocianina}] = 1.5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) y (b) hidrolizado ($[\text{Antocianidina}] = 1.2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).

A cada uno de los extractos se les adicionó un volumen conocido de soluciones de los iones metálicos que de acuerdo con los resultados del análisis por EAA se presentan en mayor concentración en el pericarpio. En la Figura 2 se observan los espectros obtenidos de cada uno de los iones metálicos con el extracto hidrolizado.

En todos los casos se observa que hay un desplazamiento batócrómico del máximo observado en la Figura 1 de 285 a 295 nm, región correspondiente a la transición electrónica $n \rightarrow \pi^*$, que puede deberse a una complejación entre el ion metálico y la antocianidina; en este mismo máximo se presenta un efecto hipercrómico en todos los casos.

Otro efecto que se observa al agregar la solución de ion metálico es en la disminución de la intensidad del mínimo que se presenta en 260 nm, este efecto es menor para el caso del Ca (II) y similar para el Cu (II), Mg (II) y Zn (II).

En cuanto a la estabilidad del extracto con la presencia de iones metálicos, se obtuvieron los espectros un día después y se obtuvo para todas las soluciones que prácticamente no hay cambio en la intensidad de las bandas, en la Figura 3 se muestra el espectro para Ca (II). Este efecto

resulta interesante, debido a que en trabajos previos [5] se habían realizado cinéticas de la antocianina en solución acuosa observándose una disminución en la intensidad en los primeros minutos, tal como se observa en la Figura 3.

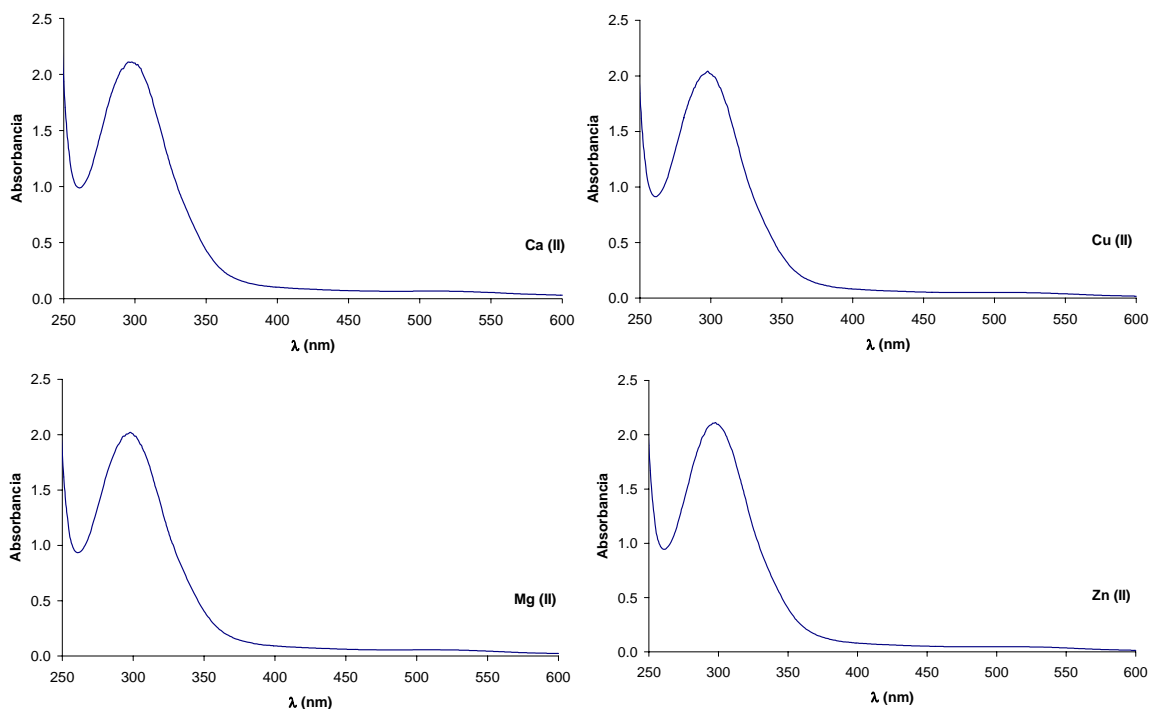


Figura 2. Espectros de UV/Vis para la mezcla de extracto hidrolizado con soluciones de $[Ca(II)]=1.67 \times 10^{-4}$, $[Cu(II)]=1.05 \times 10^{-4}$, $[Mg(II)]=2.73 \times 10^{-5}$ y $[Zn(II)]=1.02 \times 10^{-4}$ (mol L⁻¹).

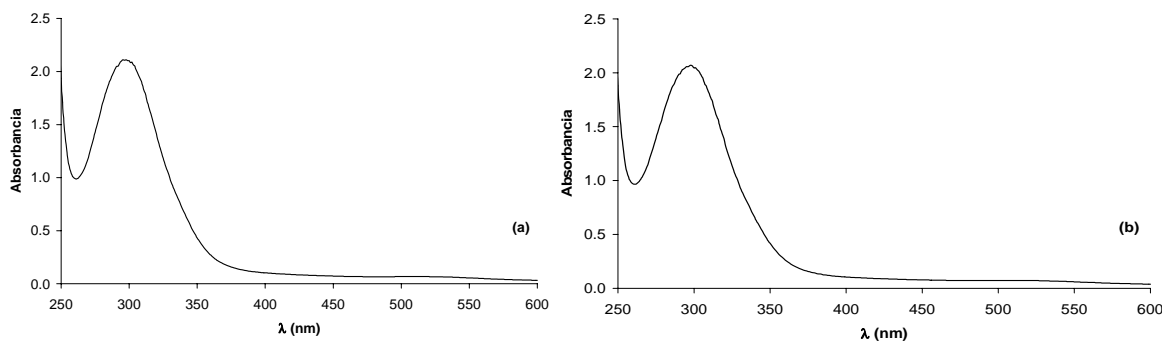


Figura 3. Espectros de UV/Vis para la mezcla de extracto hidrolizado con solución de Ca(II). (a) 0 día, (b) 1 día.

La Figura 4 muestra los espectros obtenidos de las mezclas de iones metálicos con el extracto no hidrolizado. En todos los casos y al igual que con el extracto hidrolizado, se observa un desplazamiento batócrómico y un efecto hipercrómico del máximo observado en la Figura 1 de 280 a 290 nm. Este cambio en las bandas de absorción se puede deber a la complejación entre el ion metálico con los grupos hidroxilo (en posición *orto*) del anillo B de la antocianina, grupos que también se encuentran en la antocianidina (especie predominante en el extracto hidrolizado).

En cuanto al máximo en 501 nm, se observa un ligero efecto hipocrómico cuando están presentes los iones metálicos, esto se debe a que si hay una complejación con el ion metálico, la conjugación en el grupo cromóforo (elionflavilio) disminuye.

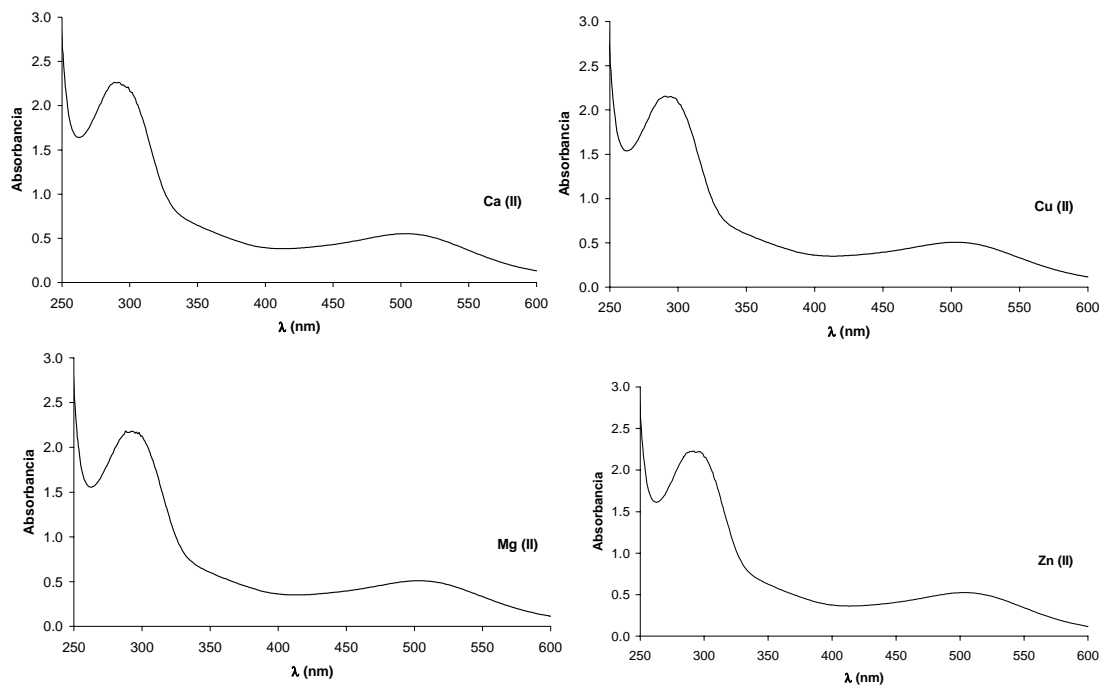


Figura 4. Espectros de UV/Vis para la mezcla de extracto no hidrolizado con soluciones de $[Ca(II)]=1.67 \times 10^{-4}$, $[Cu(II)]=1.05 \times 10^{-4}$, $[Mg(II)]=2.73 \times 10^{-5}$ y $[Zn(II)]=1.02 \times 10^{-4}$ (mol L⁻¹).

De la estabilidad del extracto sin hidrolizar con la presencia de iones metálicos, también se obtuvieron los espectros un día después y se encontró para todas las soluciones que la banda en 290 nm sufre un pequeño abatimiento en la absorbancia (para Ca de 0.2648); sin embargo, en la banda en 501 nm no hay cambio alguno, por lo que es un efecto positivo para el extracto, ya que también en este extracto se había observado en trabajos anteriores [5] una pérdida de intensidad en dicho máximo. Los espectros UV/Vis para Ca con el extracto no hidrolizado se muestran en la Figura 5.

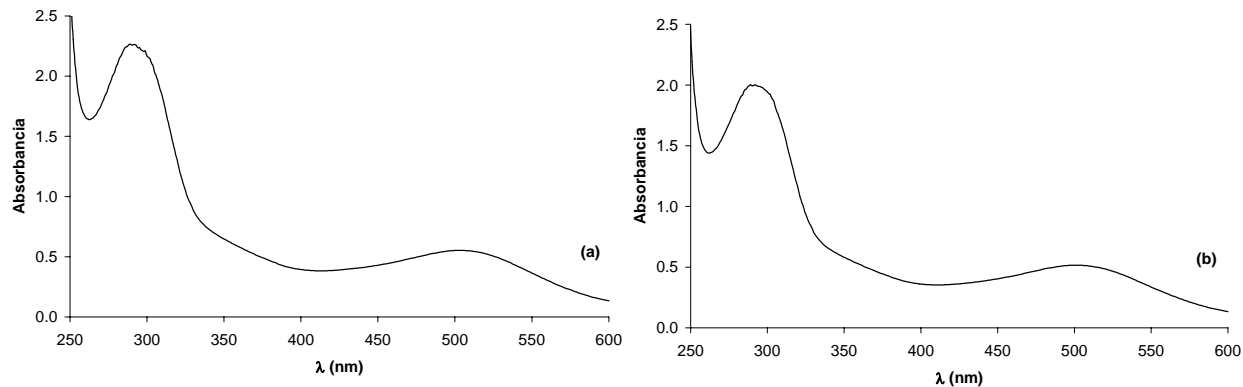


Figura 5. Espectros de UV/Vis para la mezcla de extracto no hidrolizado con solución de Ca(II). (a) 0 día, (b) 1 día. En la Figura 4 se presentan los espectros UV/Vis para el extracto no hidrolizado en solución acuosa, al inicio, 30 minutos y 1 día; en el espectro de 1 día se tiene una pérdida de absorbancia de 0.1068 (aproximadamente el 15%).

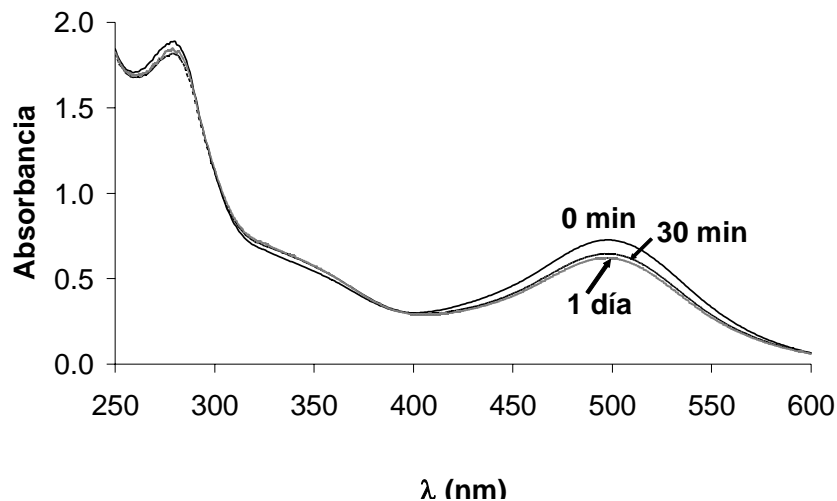


Figura 6. Espectros de UV/Vis para el extracto no hidrolizado en solución acuosa, al inicio, 30 minutos y 1 día de cinética.

4. Conclusiones

- Los resultados obtenidos demuestran que los metales predominantes en el pericarpio son Ca, Cu, Mg y Zn. Consecuentemente pueden considerarse posibles responsables de la estabilización del color de las antocianinas del maíz criollo azul.
- Especial interés presenta el Ca, debido a que:
 - a) Es el metal que se encuentra en mayor concentración en el pericarpio.
 - b) Permite la estabilización en la antocianina (ya que no presenta ningún cambio en la región del visible en 24 horas).
 - c) Forma parte del $\text{Ca}(\text{OH})_2$ utilizado en el proceso de nixtamalización.

5. Agradecimientos

ACO agradece al CONACyT la beca otorgada (Núm. de registro 193400) para realizar estudios doctorales.

6. Referencias

-
- [1] M. Rein. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. University of Helsinki. Helsinki, Finland (2005).
 - [2] R. Boulton. Am. J. Enol. Vitic. **52:2**, 67-87 (2001).
 - [3] C. George, W.P. Ridley, J.C. Obert, M.A. Nemeth, M.L. Breeze, J.D. Astwood, J.D. J. Agric. Food Chem. **52**, 4149-4158 (2004).
 - [4] A. Castañeda Ovando, M. L. Pacheco Hernández, C. A. Galán Vidal. Estudio de la Interacción Metal-Antocianina por Electroforesis Capilar. Memorias in extenso XIX Congreso Nacional de Química Analítica. Guadalajara, Jalisco, México, 2005. ISBN-970-31-0523-8.
 - [5] A. Castañeda Ovando, L. H. Mendoza Huízar, M. L. Pacheco Hernández. Estudios de Cinética y Cálculos Teóricos de Constantes de Acidez para Antocianinas presentes en el Maíz Criollo Azul. Memorias in extenso del XVIII Congreso Nacional de Química Analítica. Pachuca, Hidalgo, México, 2004. ISBN 970-31-0302-2.