

CAPÍTULO 2

2.1 PLAN DE TRABAJO

1.- Selección de la materia prima y extracción del pigmento (antocianina).

Como fuente de antocianinas se seleccionó la rosa. La rosa tiene concentraciones similares de cianidina, peonidina y pelargonidina. El pigmento fue extraído según el método reportado por Guisti y Wrolstad (2001).

2.- Diseño de los Sistemas modelo.

Se hicieron sistemas modelo igualando la concentración de antocianina del extracto final de la materia prima con los diferentes copigmentos seleccionados: ácido vainillico, ácido, gálico, ácido benzoico, ácido cafeico y ácido ascórbico. Los sistemas se hicieron por duplicado y se mantuvo también un control. Los sistemas se mantuvieron a concentración constante de 1:1, luz, pH 3 y a 50 °C.

3.- Desarrollo de los sistemas modelo.

Se determinaron los diferentes cambios en los días, 0, 1, 3, 6 10 y 17 de cada uno de los sistemas, así como de su duplicado; se sacaron las respectivas absorbancias a pH 1 y a pH 4.5 para poder calcular la concentración por el método de pH diferencial. También se determinó la absorbancia de cada uno con agua y con bisulfito, además del cambio de color en un colorímetro Gardner Colorgard System.

En seguida se establecieron nuevamente otros sistemas acorde con los primeros resultados obtenidos. Ahora se seleccionaron solamente los sistemas de ácido vainillico y ácido cafeico, ya que fueron los que mostraron una tendencia de estabilización a las condiciones dadas. Las variantes fueron las concentraciones del copigmento, siendo de 0.5:1, 1:1 como control y 2:1. Se conservaron las mismas variables de pH 3, luz y 50°C. Estos sistemas también se hicieron por duplicado.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó como materia prima rosas rojas como fuente de las diversas antocianinas que contienen. La parte experimental de esta tesis se realizó en el Laboratorio de Investigación de Alimentos de la UDLA-P, con el financiamiento de CONACYT/INIP a través del proyecto “Antocianinas monoméricas y copolimerizadas: Caracterización, síntesis y su uso como colorantes”. En cada uno de los pasos de la metodología se especifican los instrumentos y aparatos utilizados.

MÉTODOS

2.2.1 Extracción de los pigmentos de las fuentes de antocianinas

La extracción del pigmento se realizó de acuerdo con el método descrito por Guisti y Wrolstad (2001), pero con algunas modificaciones ya que se usó etanol acidificado en contacto directo con la materia prima, en lugar de acetona o metanol, durante 24 horas. El extracto se filtró con un filtro Whatman No.1 para separarlo de sólidos. De la solución obtenida se redujo su volumen, contenido en un embudo de bola en el rotavapor Buchi a 35°C aproximadamente para eliminar solamente el etanol empleado. La fase coloreada se almacena en un envase oscuro, bien cerrado y a 4°C. Se obtiene suficiente extracto para los diferentes sistemas modelos y para las diferentes determinaciones que se llevarán a cabo posteriormente.

2.2.2 Purificación del extracto

El extracto de antocianina del paso anterior se filtró usando una resina absorbente de grupos fenólicos, polivinil-poli-pirrolidona (PVPP, Sigma). Una cama de resina de un centímetro de espesor se colocó en un embudo Buchner con un filtro Whatman No.1. La resina se lavó con etanol acidificado al 0.001% HCl seguido por agua acidificada al 0.01% HCl. El extracto de antocianina se filtró al vacío pasándola por dicha resina donde quedaron retenidos pigmentos que se lavaron con agua acidificada, y la antocianina se extrajo eluyendo con etanol acidificado. La solución se concentró a 40°C aprox. en el rotavapor.

La solución conteniendo la antocianina se filtró al vacío a través de un cartucho SPE con resina C-18. Se lavó primero 3 mL del extracto con 6 mL de agua acidificada para separar los contaminantes, y después separando la antocianina con 6 mL de etanol acidificado en un matrás

diferente y así obteniendo finalmente una solución aún más purificada, con una concentración más alta de antocianina, así sucesivamente hasta pasar todo el extracto original. La solución etanólica resultante se concentró a 40°C aprox. en el rotavapor.

2.2.3 Determinaciones espectrofotométricas de los sistemas

2.2.3.1 Concentración de Antocianina monomérica

Debido a que las antocianinas pueden estar en diferentes estructuras reversibles cambiando su pH, también pueden tener cambios en sus espectros de absorción, por lo que la concentración de antocianina monomérica se determinó por el método de pH-diferencial. Este método permite una medición rápida y precisa de las antocianinas totales aún en presencia de pigmento degradado polimerizado o en presencia de cualquier otro compuesto interferente [Rodríguez-Saona y Wrolstad, 2001]. Por lo tanto para determinar la concentración de antocianinas por este método se aplica la siguiente fórmula [Feluki, Francis 1968]:

$$\text{Concentración de Antocianina (mg L}^{-1}\text{)} = [A / EL] * [1000] * [PM] * [FD]$$

Donde:

$$A = (A_{510 \text{ pH } 1} - A_{700 \text{ pH } 1}) - (A_{510 \text{ pH } 4.5} - A_{700 \text{ pH } 4.5})$$

E= Absortividad molar, siendo para la cianidina-3-glucósido 26,900.

L = Longitud de la celda, cuyo valor generalmente es de 1.

PM de la Antocianina de mayor concentración en la materia prima. En rosas se toma la cianidina-3-glucósido y su peso molecular es de 449.2 g mol⁻¹.

Procedimiento:

Se preparó el buffer a pH 1 de cloruro de potasio 0.025M ajustando con HCl y el buffer a pH 4.5 de acetato de sodio 0.4M ajustando con HCl. A 300 µL de extracto se le agregaron 600 µL de un buffer y se tomaron las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro. Para cada muestra se hizo un barrido espectral de 400 a 700 nm y se tomaron los valores de absorbancia máxima de 510 aproximadamente (absorbancia de la antocianina) y 700 nm (lectura de grado de degradación del compuesto y lectura de corrección debido a sustancias interferentes). Este procedimiento se realizó tanto a pH 1 como a pH 4.5, siendo el factor de dilución de 1:3. La absorbancia máxima observada se tomó en el rango menor a 1, siendo alrededor de 0.6 el óptimo. Como solución blanco se empleó agua destilada.

2.2.4 Análisis de color

Se utilizó el método descrito por Guisti y Wrolstad (1996), donde se determinaron los valores de Lh, ah y bh en un colorímetro. Las mediciones se hicieron para transmitancia. Y se hicieron dichas determinaciones para las dos fases de esta investigación.

2.2.4.1 Índice de degradación

El índice de degradación se determinó por medio de la absorbancia del pigmento eluido con bisulfito de sodio y con agua por separado.

2.2.4.2 Parámetros de color

El tratamiento de extractos acuosos de antocianinas con bisulfito de sodio y su posterior lectura espectrofotométrica ha permitido determinar algunos índices o parámetros de color, desarrollados por Somers y Evans (1974) que incluyen:

- 3 Densidad de color: Expresa el color debido a antocianinas monoméricas o copolimerizadas presentes y las reacciones de oscurecimiento.
- 4 Color polimérico: Este parámetro expresa el color debido a antocianinas copolimerizadas y de reacciones de oscurecimiento. Color resistente al blanqueado con bisulfito de sodio.
- 5 Porcentaje de taninos o porcentaje de color polimérico: Se define como la relación del color polimérico entre la densidad de color y expresa el porcentaje de color debido al material copolimerizado.
- 6 Color por antocianinas: Expresa el color debido a antocianinas monoméricas que son rápidamente blanqueadas por bisulfito de sodio.

Procedimiento:

Se tomaron 840 μ L de extracto y se diluyeron con 60 μ L de agua y se tomó su lectura en el espectrofotómetro a 510 (absorbancia máxima), 420 y 700 nm. Por otro lado se tomó la misma cantidad de extracto pero ahora se eluyó con 60 μ L de bisulfito de sodio. La preparación de bisulfito de sodio se realizó cada día de lectura, de lo contrario, se podía presentar una contribución de color amarillo en las lecturas de absorbancia. El factor de dilución de la muestra

fue de 1.2 y se determinó en función de las lecturas de absorbancia obtenidas. Como solución blanco o de referencia se empleo agua destilada.

Los cálculos para determinar los parámetros de color fueron los siguientes:

Muestra sin tratar:

$$\text{- Densidad de color (DC)} = [(A_{\text{max}} - A_{700}) + (A_{420} - A_{700})] * \text{FD}$$

Muestra tratada:

$$7 \quad \text{Color polimérico (CP)} = [(A_{\text{max}} - A_{700}) + (A_{420} - A_{700})] * \text{FD}$$

$$8 \quad \text{Porcentaje de taninos} = (\text{CP} / \text{DC}) * 100$$

$$9 \quad \text{Color por antocianinas} = [A_{\text{max}}(\text{s} / \text{bisulfito}) - A_{\text{max}}(\text{c}/\text{bisulfito})] * \text{FD}$$

2.2.5 Determinaciones colorimétricas

Usando un colorímetro Gardner (System/05) con un aditamento de transmitancia y una celda con un paso de luz de 0.21 cm se determinaron los valores triestímulo de Hunter (L, a y b). Con estos valores se calcularon el tono (hue), pureza o saturación (chroma) y diferencia neta de color entre los sistemas modelo. Para calcular los parámetros antes mencionados se usaron las siguientes fórmulas:

$$10 \quad \text{Tono} = \tan^{-1} (b/a)$$

$$11 \quad \text{Pureza} = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

$$12 \quad \text{Diferencia neta de color} = \Delta E = ((a - a_0)^2 + (b - b_0)^2 + (L - L_0)^2)^{1/2}$$

Procedimiento:

3 mL de muestra se colocaron en la celda y se tomó la lectura directa de los valores Lh, ah y bh del colorímetro Gardner.

2.2.6 SISTEMAS MODELO

Los primeros sistemas modelo se siguieron por 17 días, teniendo mediciones los días 0, 1, 3, 6, 10 y 17, con lo que se pudo seguir el comportamiento de cada uno de los sistemas diseñados con los diferentes co-pigmentos, 1 : 1 (Antocianina : Copigmento), a las condiciones de pH 3, 50°C, y exposición a la luz.

Los copigmentos seleccionados se prepararon 100 veces más concentrados para poder hacer una dilución y por lo tanto que sea más fácil su medición, ya que se trata de pequeñísimas cantidades para pesar.

Los sistemas de la fase 1 fueron diseñados de la siguiente manera: Se tomaron 50mL del extracto, diluido en un buffer pH 3 de fosfato citrato y cada uno, con su respectivo duplicado, con 0.5mL de uno de los 5 copigmentos seleccionados. Además se tomó una muestra, sin copigmento, para tener el control.

Los sistemas resultaron de la siguiente manera:

- Sistema 1 y 1.1 con ácido benzoico
- Sistema 2 y 2.2 con ácido vainílico
- Sistema 3 y 3.3 con ácido ascórbico
- Sistema 4 y 4.4 con ácido cafeico
- Sistema 5 y 5.5 con ácido gálico.