

Estudios de cinética y cálculos teóricos de constantes de acidez para antocianinas presentes en el maíz criollo azul.

Araceli Castañeda Ovando, Luis H. Mendoza Huízar, Ma. de Lourdes Pacheco Hernández*
 Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Carr. Pachuca-Tulancingo Km. 4.5, C.P. 42076, Hidalgo, México, Tel. 01 (771) 717 2000, ext 6785. E-mail: ovando_8@yahoo.com.mx, hhuizar@uaeh.reduaeh.mx, mpacheco@uaeh.reduaeh.mx

Introducción

Las antocianinas representan los principales pigmentos solubles en agua, que son visibles al ojo humano, son las responsables directas de los brillantes colores naranja, rosa, rojo, escarlata, violeta y azul en los pétalos de las flores y frutos de algunas plantas como las fresas, uvas de cáscara roja, manzanas, cerezas, rábanos, capulines, col morada, y el propio maíz¹.

En la Tabla 1 se presentan las principales antocianinas presentes en el maíz como lo reporta la literatura², cabe señalar que estos datos son dados para el maíz de origen peruano, inglés y boliviano, no existiendo actualmente reportes para el maíz mexicano.

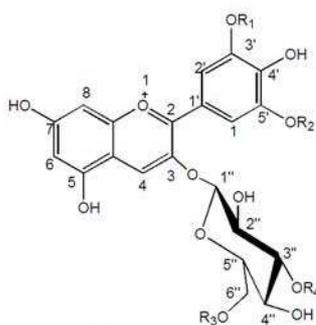


Figura 1. Estructura general para las antocianinas. Ver Tabla 1 para los detalles de los grupos R₁, R₂, R₃ y R₄.

Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Abundancia relativa (%)
Cianidina -3- (glucósido)	H	H	H	H	48 – 49
Cianidina -3-(6''-malonilglucósido)	H	H	Ma	H	26
Cianidina -3-(3'',6''-dimalonilglucósido)	H	H	Ma	Ma	16-17
Peonidina -3-(glucósido)	Me	H	H	H	2
Peonidina-3-(dimalonilglucósido) [no se ha determinado el tipo de derivado]	Me		Gl		1

Tabla 1. Antocianinas presentes en el maíz, la abundancia relativa es en base al contenido total de antocianinas; Me=metilo, Gl=glucosa, Ma=malonil.

Equilibrios Ácido-Base presentes en las Antocianinas

Asimismo, se ha encontrado reportado en la literatura³ que las antocianinas presentan diferentes formas químicas que dependen del pH de la solución (sin reportar en ningún caso el valor de las constantes de estabilidad). A valores de pH cercanos a 1, el catión flavilio (color rojo) es la especie predominante responsable de los colores rojo, púrpura y azul. Entre valores de pH 2- 4 predominan las especies quinoidales azules. A valores de pH entre 5 y 6, predominan dos especies incoloras, las cuales tienen una pseudobase carbinol y una estructura chalcona, respectivamente. A valores de pH mayores a 7 las antocianinas rápidamente se degradan.

Estabilidad de las Antocianinas

Hasta ahora, las antocianinas no han sido utilizadas ampliamente en los alimentos y bebidas, debido a que no son tan estables como los colorantes sintéticos. La estabilidad del color de las antocianinas depende de una combinación de varios factores tales como su estructura, la concentración en la que se encuentran, el pH, la temperatura y la presencia de agentes complejantes (fenoles, metales)⁴. Otras investigaciones sugieren que la copigmentación molecular de antocianinas con otros compuestos (copigmentos) es el mecanismo principal de estabilización de color en las plantas⁵; generalmente el copigmento por sí solo es incoloro, pero cuando se

agrega a una solución de antocianina, éste refuerza el color de la solución grandemente. Los copigmentos pueden ser flavonoides, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, polisacáridos, metales u otra antocianina.

Cálculos teóricos de constantes de acidez

Actualmente existe una gran cantidad de trabajos reportados en el área de la química cuántica computacional para realizar la predicción de valores de constantes de acidez (pKa's) de diferentes moléculas. A este respecto, se han publicado varios trabajos reportando comportamientos adecuados para una serie de compuestos, resultando en la mayoría de los casos muy cercanos a los pKa's obtenidos de manera experimental⁶⁻⁷.

Dentro de los diferentes métodos utilizados para predecir estos valores, se encuentran aquellos que suponen que un cambio en el potencial electrostático es la contribución más importante en el cambio de acidez en la molécula⁸⁻⁹. Aun cuando este método es uno de los más sencillos e ignora algunas interacciones electrón-electrón, su aplicación ha dado buenos resultados en la predicción de pKa's con un costo computacional relativamente barato.

En este estudio se presentan los resultados de estabilidad de las antocianinas en medio ácido (mediante espectrofotometría UV/Vis) ya que es donde mas aplicaciones pueden tener como colorantes de alimentos y por otra parte, debido a la ausencia de datos de constantes de estabilidad reportados para este tipo de antocianinas, el objetivo de este trabajo es calcular las constantes termodinámicas teóricas de las antocianinas en solución acuosa para posteriormente compararlas con las obtenidas experimentalmente.

Experimentación

Debido a la dificultad que se presentó al analizar las antocianinas extraídas del maíz molido, se decidió realizar la extracción de las antocianinas presentes únicamente en el pericarpio del grano del maíz. Para esto, se colocaron en agua los granos de maíz, se removieron los pericarpios del grano y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Extracción: De estudios preliminares, se obtuvo que el mejor extractante es el metanol acidificado (2% de HCl) y se siguieron los mismos procedimientos de extracción y purificación por cromatografía en columna como lo reporta la literatura¹⁰. Finalmente, el extracto fue liofilizado.

Estudios de Cinética: Los estudios de cinética se realizaron en agua (pH~6) y en buffer de citratos 50 mM a pH 3.40. Para el caso del agua se pesaron 65 mg del extracto liofilizado, disolviéndose en el solvente y aforando a 10 mL. Para el buffer se siguió el mismo procedimiento que para el caso del agua, pero únicamente se pesaron 31 mg de antocianina liofilizada.

Cálculos Teóricos de pKa's de la Antocianina Mayoritaria: De acuerdo con lo reportado por Fossen y colaboradores¹¹ la antocianina mayoritaria en el maíz es la cianidina-3-glucósido, aunque el dato es reportado para el maíz de origen peruano, se tomó como referencia el mismo compuesto para el maíz utilizado en el presente proyecto.

Los cálculos teóricos de las constantes de acidez se hicieron únicamente para la molécula mayoritaria, utilizando los potenciales electrostáticos como una medida de la acidez de los protones en la molécula.

Resultados y discusión

Estudios de Cinética.

Según lo reportado por Harborne¹², en general, las antocianinas en solución acuosa presentan 2 bandas para los flavonoides (Banda I y II); para el caso de las antocianinas la Banda II se presenta entre 240 y 285 nm (banda intensa) y la Banda I entre 480 y 550 nm, siendo la primera más intensa.

En solución acuosa a pH= 6.0

En la Figura 2 se muestra la presencia de las dos bandas; observándose 2 máximos de absorción, el primero en 280 nm y el segundo cercano a 500 nm.

De acuerdo a los espectros mostrados en la Figura 2, se puede observar que existe un efecto hipocrómico en los primeros 20 minutos y el siguiente efecto importante se da al cuarto día del estudio de la cinética. También, si se hace una comparación entre el primer día (0 minutos) y el último día de seguir la cinética (11° día), se puede ver una pérdida de intensidad de aproximadamente el 20% (comparando las absorbancias respectivas en cada día).

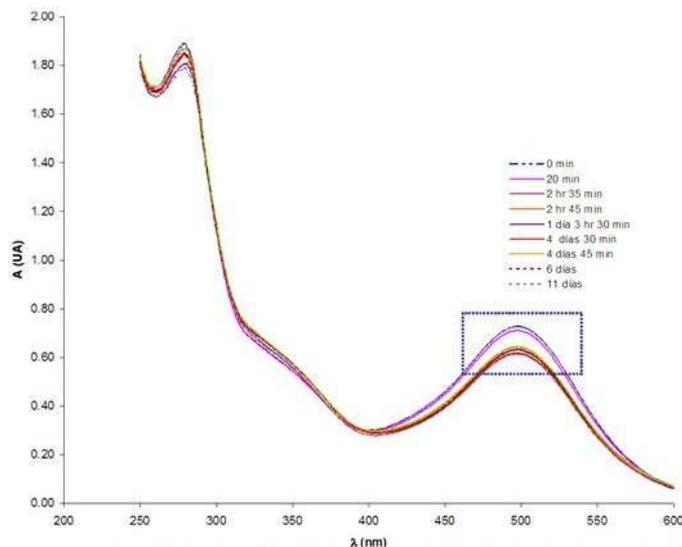


Figura 2. Espectros de UV vis obtenidos de llevar a cabo la cinética de la mezcla de antocianinas contenidas en el maíz criollo azul, usando como medio agua, a 25°C.

De los datos obtenidos por Espectroscopía UV/Vis se puede calcular el coeficiente de absorptividad molar de la mezcla de antocianinas, de acuerdo a la Ley de Lambert – Beer. Tomando el valor de la absorbancia del máximo en $\lambda=498$ nm, a los 11 días: $A= 0.6118$ y $\epsilon=0.09412 \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ L}^{-1}$.

En solución de buffer de citratos 50 mM a pH= 3.404

En la Figura 3 se presentan los espectros UV/Vis donde se muestran las dos bandas esperadas para las antocianinas (la primera en 280 nm y la segunda cercana a 500 nm).

De acuerdo a estos espectros (Figura 3) se observa un efecto hiperocrómico, prácticamente durante todo el tiempo en que duró la cinética, esto es debido principalmente a la presencia del buffer, el cual al ser preparado de un ácido orgánico (ácido cítrico), éste funciona como un copigmento,

ocasionando cambios en la absorción de las antocianinas y provocando asimismo que no haya pérdidas de coloración; es decir, permitiendo mayor estabilidad en las moléculas.

De los datos obtenidos por Espectroscopía UV/Vis se puede calcular el coeficiente de absorción molar de la mezcla de antocianinas, en medio de citratos pH 3.404, de acuerdo a la Ley de Lambert – Beer. Tomando el valor de la absorbancia del máximo en $\lambda=498$ nm, a los 2 días 4 hr 15 min: $A=0.4297$, $\epsilon=0.13861$ $\text{cm}^{-1}\text{g}^{-1}\text{L}^{-1}$.

Comparando los coeficientes de absorción molar obtenidos para las antocianinas disueltas en agua ($\epsilon=0.09412$ $\text{cm}^{-1}\text{g}^{-1}\text{L}^{-1}$) y en buffer ($\epsilon=0.13861$ $\text{cm}^{-1}\text{g}^{-1}\text{L}^{-1}$) se observa que hay mayor conjugación de las moléculas en presencia de buffer de citratos, esto se puede deber a la formación de un complejo entre el buffer y las moléculas de interés, originando la copigmentación de las mismas.

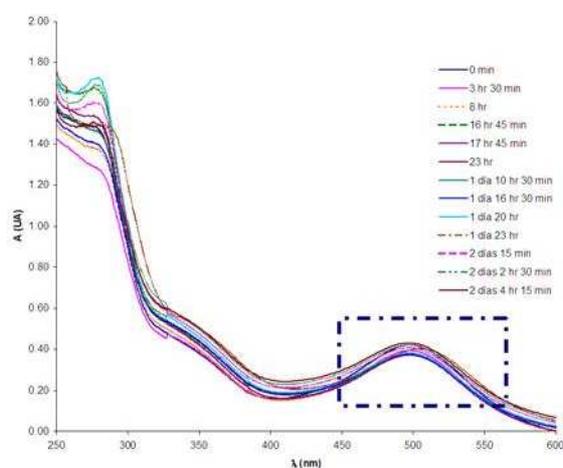


Figura 3 Espectros de UV vis obtenidos de llevar a cabo la cinética de la mezcla de antocianinas contenidas en el maíz criollo azul, usando como medio buffer de citratos 50 mM pH 3.404, a 25°C.

En la Figura 4 se presentan los dos espectros obtenidos al inicio y al final de la cinética, observándose claramente en toda la ventana espectral un efecto hipercrómico.

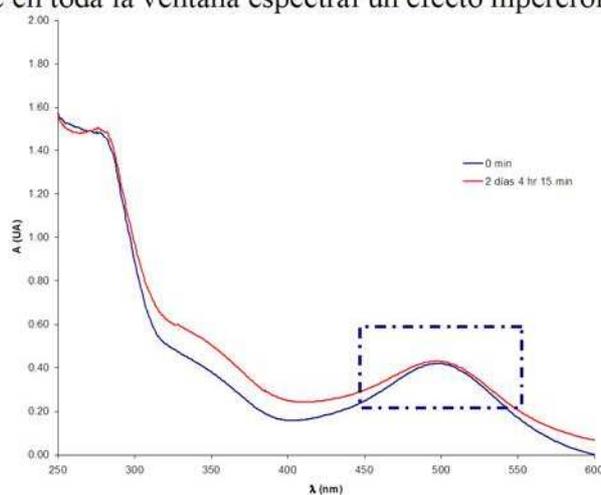


Figura 4. Efecto del buffer de citratos 50 mM (pH 3.404) en la copigmentación de las antocianinas contenidas en el maíz criollo azul.

Debido a la complejidad del sistema real, se decidió calcular las constantes de acidez teóricas para la cianidina-3-glucósido.

Cálculos teóricos de pKa's de la Antocianina Mayoritaria.

Como una primera aproximación, en el presente trabajo se analizó la variación en el potencial electrostático para determinar los cambios de acidez en la molécula y con esto correlacionar estos cambios a los valores de las constantes de acidez que pudiera presentar la molécula.

Es importante mencionar que un aspecto clave en la predicción de las propiedades al nivel electrónico de un sistema molecular, está relacionado con la distribución espacial de sus componentes. Con la intención de determinar la estructura de mínima energía se realizó una optimización de geometría de la antocianina esquematizada en la Figura 1 a un nivel abinitio HF/3-21G*. Para asegurar que esta estructura corresponde a un mínimo en la superficie de energía potencial se realizó también un cálculo de frecuencias en donde todas estas resultaron positivas. La estructura energéticamente optimizada se representa en la Figura 5.

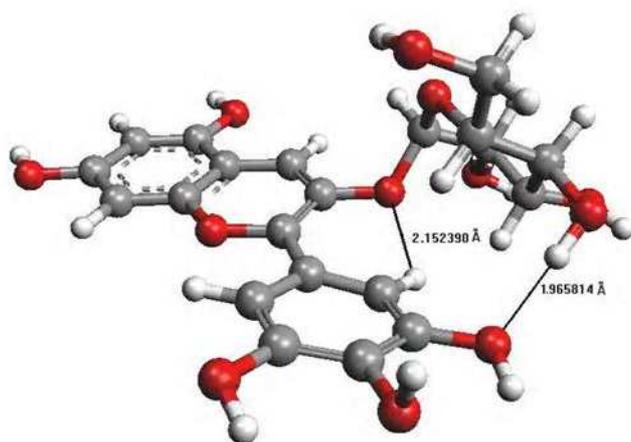


Figura 5. Estructura energética optimizada de la antocianina mayoritaria: cianidina-3-(glucósido).

Resulta interesante notar, la existencia de dos puentes de hidrógeno intramoleculares, con valores de 2.15 y 1.96 Å, lo que sugiere una gran estabilidad interna en la molécula. Cabe resaltar que estos puentes de hidrógeno son los responsables de que los tres anillos no se encuentren en el mismo plano.

El mapa del potencial electrostático sobre una isosuperficie de densidad a un nivel AM1, Figura 6, sugiere que es sobre los oxígenos donde se concentra la mayor parte de la carga en toda la molécula (color rojo) mientras que las regiones con menor valor de potencial electrostático (color blanco) se encuentra sobre los hidrógenos, exceptuando los que se encuentran involucrados en los puentes de hidrógeno mencionados en el párrafo anterior. Lo anterior sugiere la existencia de al menos tres constantes de acidez, debido a los diferentes valores del potencial electrostático de los hidrógenos. A partir del mapa del potencial electrostático esquematizado en la Figura 6, fue posible medir los siguientes valores de potencial electrostático: aprox. 39.13, 44.11 y 34.89 Kcal/mol. Estos valores se encuentran en el rango de potenciales electrostáticos máximos correlacionados con pKa's en fase acuosa¹³. Analizando los valores obtenidos en este trabajo las constantes de acidez predichas bajo el modelo utilizado sugieren la presencia de tres constantes de equilibrio con valores de 1.2, 2.7 y 3.9.

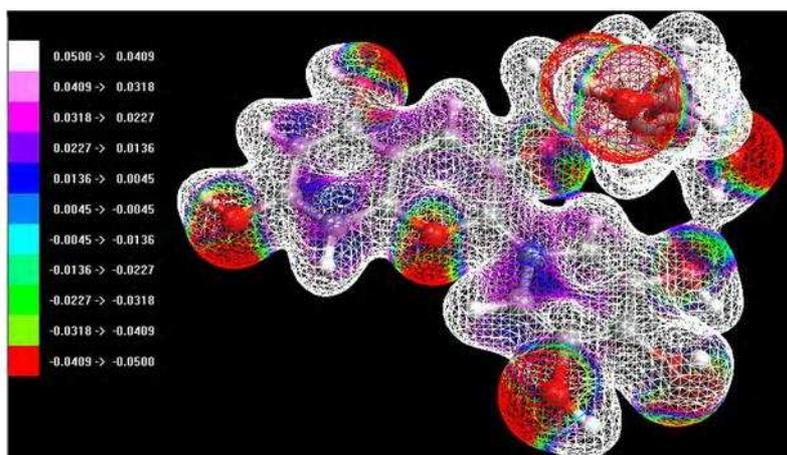


Figura 6. Mapa del potencial electrostático para la molécula de cianidina-3-(glucósido).

Conclusiones

En el presente trabajo se ha podido corroborar la formación de copigmentos en las soluciones acuosas de antocianinas, lo que ha llevado a observar un efecto hipocrómico (disminución en la absorbancia) en el caso de la antocianina disuelta en agua y un efecto hiperocrómico (aumento en la absorbancia) en el caso de disolver la muestra en medio de ácido cítrico.

Por otra parte, se han obtenido tres constantes de acidez teóricas para la cianidina 3-glucósido, las cuales son 1.2, 2.7 y 3.9, respectivamente. Cabe resaltar que debido a la cercanía en el valor teórico de las constantes de acidez de las antocianinas, quizá ha sido la razón por la cual experimentalmente no se han podido estimar fácilmente el valor de dichas constantes con buena precisión. Sin embargo se considera que la estimación teórica de las constantes de acidez es un buen comienzo para planear los experimentos posteriores.

Agradecimientos

L.H.M.H. agradece el apoyo económico parcial otorgado por PROMEP No. de Folio UAEHGO-PTC-148 y a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. A la M.C. Ma Elena Paez Hdez.

Referencias

1. P. M. Dey, J.B. Harborne. *Plant phenolics Methods in plant Biochemistry*. APL, London (1993).
2. T. Fossen. *Biochemical Systematics and Ecology* 30 (2002) 855-864.
3. C.T. da Costa. *J. Chromatogr. A* 799 (1998) 321–327.
4. G. Mazza, R. Brouillard. *Phytochemistry* 29 (1990) 1097–1102.
5. A.J. Davies, G. Mazza. *J. of Agricultural and Food Chemistry* 41 (1993) 716–720.
6. M. Liptak, G. Shields. *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 7314-7322.
7. G. Schurmann, M. Cossi, V. Barone. J. Tomasi. *J. Phys. Chem. A* 102 (1998) 6706- 6713.
8. D.A. McQuarrie. *Statistical Mechanics*. Harper & Row, New York (1975).
9. B. Honig, A. Nicholls. *Science* 268 (1995) 1144-1149.
10. N. Kakatani, H. Fukuda, H. Fuwa. *Agric. Biol. Chem.* 43 (1979) 389-391.
11. T. Fossen, D.O. Øvstedal, M. Andersen, *Biochemical Systematics and Ecology* 30 (2002) 855–864.
12. J. B. Harborne, T.J. Mabry, H. Mabry. *The Flavonoids*. Chapman & Hall, London (1975).
13. E.P. Sarjeant, B. Dempsey, *Ionization Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*. IUPAC No. 23, Pergamon Press (1979).