

ANÁLISIS DE ANTOCIANINAS EN ARÁNDANOS del NOA (*Vaccinium corymbosum* L.)

CORIA MUÑOZ, L.; MAIHUA, R.E.; PERALTA, F.L.; TERESCHUK, M.L.;
GONZÁLEZ, M, ALBARRACÍN, P.M..

Cátedra de Química Orgánica. Departamento de Ingeniería de Procesos y Gestión Industrial. Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología. Universidad Nacional de Tucumán. Av. Roca 1800. 4000 Tucumán, Argentina. Tel:0381-4364093. Int. 7724. E-mail: mtereschuk@herrera.unt.edu.ar

1. RESUMEN

El arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L.) es una planta nativa del hemisferio norte la cual ha sido cultivada para su comercialización por años en el este de Canadá y en los Estados Unidos. Los frutos y hojas de las especies de *Vaccinium* han sido usados históricamente con fines medicinales por nativos norteamericanos para combatir infecciones urinarias, cálculos del riñón, inflamaciones, como diurético y como astringente. Las antocianinas, que le confieren el color azul al fruto, intervienen en el metabolismo celular humano disminuyendo la acción de los radicales libres, asociados al envejecimiento, cáncer, enfermedades cardíacas y Alzheimer. La identificación de estos compuestos serviría de base para nuevos estudios y su posterior aplicación en la industria alimenticia. Se identificaron de forma cualitativa las antocianinas de los frutos verdes y maduros como malvidina por comparación con estándares obtenidos de fuentes conocidas; para tal fin se empleó la cromatografía en capa fina de sílica y celulosa microcristalina.

2. INTRODUCCIÓN

El fruto del arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) es una baya pequeña (con un cáliz en forma de estrella) de color azul, de ahí la denominación de "blueberry", en inglés. Perteneciente a la familia de las Ericaceae, estas especies pueden formar grandes colonias de plantas genéticamente idénticas las cuales están conectadas bajo tierra por sus raíces.

El arándano se cultiva en todos los continentes, siendo su centro de producción los Estados Unidos y Canadá. El 60% de la producción se destina a la industria, en la elaboración de dulces, pasteles, helados y yogures; sin embargo año tras año se descubren nuevos usos. En particular se ha puesto especial atención a los estudios sobre arándanos y su comportamiento durante el almacenamiento que muestran una relación positiva entre la capacidad antioxidante y el contenido de antocianinas (Kalt y col, 1999)

Las antocianinas son el grupo más importante de pigmentos solubles en agua visibles al ojo humano presentes en frutos, pétalos de flores y hojas de plantas (Harborne, 1994). Pertenecen al grupo de los flavonoides, metabolitos secundarios de los vegetales. Los flavonoides presentan actividad antioxidante ya que son excelentes dadores de electrones o hidrógeno con la formación de radicales intermedios relativamente estables (Nawar, 1993). Este comportamiento está relacionado con la

capacidad de quelar metales, inhibir la enzima lipooxigenasa y captar radicales libres (Decker, E. A.; 1997). Como se trata de pigmentos de origen vegetal, el organismo humano no puede producir estas sustancias químicas, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos.

Las antocianinas se acumulan en vacuolas (Wagner, 1982) de células epidermales y subepidermales, que se localizan en organelas esféricas conocidos como antocianoplastos. Juegan un rol importante en la atracción de animales favoreciendo la polinización y dispersión de semillas. Las antocianinas pueden ser un factor importante junto a otros flavonoides en la resistencia contra plagas. El metabolismo biosintético de estos compuestos fenólicos parece responder a estímulos ambientales (Blank, 1947; McClure, 1975; Bohm, 1987), como el incremento de los niveles de luz (Woodhead, 1981; Mancinelli, 1985; Waterman et al., 1984). Se cree que están involucrados en algunos tipos de respuesta a factores de estrés (Chalker-Scott et al., 1989).

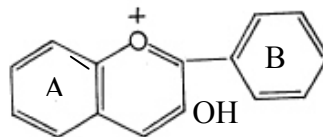
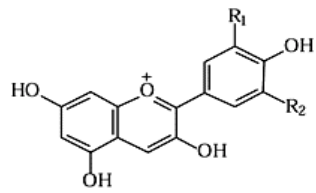


Figura 1: Estructura de la molécula de antociano.

Dado que las restricciones sanitarias hacia el uso de colorantes sintéticos han adquirido un gran peso, las antocianinas presentan un gran potencial en la industria alimentaria al considerarse inocuas y seguras como aditivos (Markakis, 1982). Las antocianinas muestran isomerización por cambios de pH, variando su color y estructura del anillo central siendo más estables en medio ácido. La coloración varía con el cambio de pH, de rojo en medio ácido, pasando por amarillo, a azul o violeta en medio alcalino, también puede formar una pseudo base incolora a pH 4,5. Debido a estas características se utilizan las antocianinas en medio ácido o ligeramente neutro en la industria alimenticia y como indicadores.

En los frutos, las antocianinas (glicósidos) se localizan principalmente en la cáscara, y en menor medida en la pulpa y pueden contener un solo tipo de pigmento, como en la manzana (*Pyrus malus*). En cambio, los arándanos contienen la combinación de cinco de las seis antocianidinas (agliconas) comunes. La limitada variación de antocianinas en frutos no es comparable con la de las flores, donde se han registrado cincuenta diferentes, de las cuales la cianidina es la más común, le siguen la peonidina, delfinidina, pelargonidina, malvidina y petunidina (Gross, 1987; Macheix et al., 1990; Van Buren, 1970)



	R₁	R₂
CIANIDINA	OH	H
PEONIDINA	OCH ₃	H
DEFFINIDINA	OH	OH
PETUNIDINA	OCH ₃	OH
MALVIDINA	OCH ₃	OCH ₃
PELARGONIDINA	H	H

Figura 2: Estructura de antocianidinas comúnmente encontradas en flores

Para la extracción de estos pigmentos se ha utilizado la maceración del tejido en ácido clorhídrico 1%, metanol 80%. La acidificación con ácidos fuertes como el HCl sirve para mantener un pH bajo. Este puede, sin embargo, alterar la forma nativa del complejo de pigmentos rompiendo asociaciones con metales, copigmentos y proteínas (Moore et al, 1982). Para obtener antocianinas lo más naturalmente posible, el uso de solventes neutros (por ejemplo, 60% metanol, etilenglicol, n-butanol, acetona) y ácidos orgánicos débiles (ácido fórmico, ácido acético) han sido recomendados (Hendry, 1992). Kalt y MacDonald (2002), describieron un proceso para la recuperación de antocianinas de arándano con un sistema solvente de MeOH:H₂O: ácido fórmico (70:28:2) (Agilent Technologies, 2002).

Las reacciones químicas selectivas para grupos de compuestos en la cromatografía en papel (CP), y la cromatografía gaseosa (CG), han sido importantes métodos en el análisis cualitativo de compuestos fenólicos (Harborne, 1975; Harborne, 1994). La cromatografía en capa delgada (TLC) tiene sus propias ventajas (rapidez, bajo costo). Así también las modernas técnicas de detección mediante densitómetros y cámaras digitales, han incrementado su versatilidad como un método mundialmente empleado para el análisis de compuestos fenólicos (García y col., 1993; Summanen, 1999), éste es un método práctico que utiliza eluyentes como BAW (n-butanol-ácido acético glacial-agua, 4:1:5), AWH (ácido acético glacial-agua-ácido clorhídrico, 15:82:3), HCl 1% (HCl concentrado-agua, 3:97) y Fórmico (ácido clorhídrico concentrado-ácido fórmico-agua, 2:5:3); la utilización de varios solventes ofrece mejores resultados comparativos (Francis, 1982; Gross, 1987; Harborne, 1967; Harborne et al., 1973; Harborne, 1994).

No puede dejar de mencionarse la versatilidad de la metodología de detección a través de HPLC-DAD para estos compuestos.

Al ser metabolitos secundarios, la cantidad y calidad de antocianinas en los frutos dependerá, además de lo antes mencionado, de su fase de desarrollo; se observa que para el fruto de arándano, el pigmento adquiere su verdadera forma cuando el fruto se vuelve maduro, mientras tanto el fruto verde presenta compuestos que podrían considerarse precursores de las antocianinas propiamente dichas.

Con el objeto de comparar la evolución del contenido de antocianos a lo largo de su maduración y su comportamiento durante el almacenamiento, se trabajó con tres muestras bien diferenciadas de un mismo fruto: arándanos inmaduros, arándanos

maduros conservados en heladera y arándanos maduros conservados en freezer. Los resultados obtenidos servirán de base para realizar estudios posteriores de sus capacidades como estabilizantes, colorantes y saborizantes de origen natural para productos alimenticios (ej.: alimentos funcionales).

3. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue comparar el contenido de antocianos de arándanos del NOA, en dos estadios de maduración y según el método de conservación. Además se cuantificaron los pigmentos en frutos maduros conservados en heladera y freezer.

4. METODOLOGÍA

4.1) *Material Vegetal*. Los frutos maduros fueron donados por la sección de horticultura de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres, en el mes de mayo; se encontraban conservados en heladera (2 a 6 °C). Para mejores resultados comparativos, una parte de los frutos maduros fueron colocados en heladera y la otra en freezer. Los frutos verdes, recién cosechados, fueron donados en Monteros, Tucumán; la colecta también fue realizada en el mes de mayo aproximadamente en la mitad de la etapa de maduración.

4.2) *Extracción*. Se pesaron 5 gr de los frutos fueron finamente picados y macerados con 50 ml de Etanol – HCl 1%, (80:20) por 24 horas. Se realizaron tres filtraciones sucesivas. La solución filtrada de cada muestra se concentró al vacío en evaporador rotatorio y luego se llevó a sequedad.

4.3) *Análisis químico de los extractos*. Para la separación de los extractos se empleó cromatografía en capa fina como criterio preliminar para la identificación de las sustancias, y también la cromatografía con soporte de celulosa.

Se sembraron tres placas, una para cada muestra. La cromatografía ascendente se realizó en una cuba saturada previamente (1 hora) con BAW (4:1:1) como fase móvil. Se utilizaron cromatoplasmas de sílica gel (Merck) de 4 x 10 cm como soporte. Las placas de sílica fueron previamente activadas en estufa durante 30 minutos a 115°C. Se utilizaron en la separación por cromatografía 30µl de extracto de aproximadamente 50 mg mL⁻¹ de concentración. Para solubilizar completamente la muestra y mantener el pH se agregó solución de extracción.

La cromatografía con soporte de celulosa microcristalina se realizó en placas de aluminio (Merck). Se utilizaron HCl 1% y AWH (ác. acético- agua- ác. clorhídrico, 15:82:3) como solventes de desarrollo.

Las placas fueron secadas bajo campana y luego se midieron los Rf. Los valores de Rf obtenidos fueron comparados con datos encontrados en la literatura.

4.4) *Determinación de antocianos totales*. Se cuantificaron antocianos totales con respecto a malvidina 3 glucósido, según metodología descrita por Virachnee Lohachoompol y col, 2004. Las mediciones se realizaron en un equipo Metrolab visible a 520 nm.

5. RESULTADOS

La separación de los pigmentos realizada por cromatografía en capa fina de sílica gel, permitió visualizar, en el caso de los frutos maduros, dos manchas, una rosa muy débil y otra muy nítida de color azul. En el caso del extracto de frutos verdes se consiguió la separación de dos manchas, una amarilla y otra anaranjada. Los pigmentos de interés corresponden a los frutos maduros, y en particular el de color azul, motivo por el cual se comparan Rf obtenidos para esa mancha.

Para confirmar la presencia de antocianos se realizó una co-cro-matografía con testigos, tres sistemas de solventes diferentes, dos soportes distintos en TLC (Silica y celulosa), y comparación con datos existentes en la bibliografía.

Los valores de Rf obtenidos por TLC con soporte de celulosa se muestran en la tabla 1, donde se aprecia que existe concordancia entre los valores de Rf del pigmento obtenido con los de malvidina 3-glucósido para los solventes AWH (35) y HCl 1% (6). Estos valores coinciden para las muestras de arándanos conservados en heladera y conservados en freezer; sin embargo, los arándanos verdes no proporcionaron datos suficientes para su detección.

Los valores de Rf obtenidos por cromatografía en capa fina de sílica gel se muestran en la tabla 2.

Malvidina	AWH (15:82:3)	HCl 1% (97:3)	
3-glucósido	35 (30 (a); 32(b))	5 (6(a); 5(d))	
3,5-diglucósido	43(a)	15(c)	
	Arandanos freezer	35	5
	Arandanos heladera	35	6
	Arandanos verdes	--	--

Tabla 1: valores de Rf x 100 determinados por cromatografía en capa fina de celulosa de los pigmentos en estudio, comparado con los obtenidos para diferentes mezclas solventes, por otros autores en CP. (a) Chen y Luh (1967); (b) Somaatmadja y Powers(1963). (c) Diaz y Olave (1979)

La determinación cuantitativa de antocianos totales con respecto a malvidina 3 glucósido, dio resultados similares para los arándanos frescos y los que se conservaron en freezer. (Tabla2)

Tabla 2: valores de Rf obtenidos por cromatografía en capa fina de sílica gel. Solvente BAW (4:1:1)

MUESTRA	Rf x 100	Antocianinas totales mg/100g de muestra fresca*
Arándanos Freezer	45.2	118,4± 0,5
Arándanos Heladera	46.6	159,4± 0,5

Arándanos Verdes	47.2	N.D
------------------	------	-----

* Antocianinas totales expresadas como equivalentes de malvidina 3 glucósido
N.D= No Determinado

6. CONCLUSIONES

La extracción e identificación del pigmento a través de valores de Rf dieron como resultado que la malvidina 3-glucosido es el pigmento mayoritario presente en el fruto maduro del arándano y al cual se le atribuye mayormente el color del azulado del fruto. También se concluye que el fruto verde presenta un pigmento que podría ser precursor de las antocianinas presentes en el maduro pero que no se trata de malvidina 3-glucósido.

Además se observa que el tipo de almacenamiento del fruto maduro ya sea freezer o heladera, no altera en forma evidente el contenido cualitativo de antocianinas presentes. En cuanto a la cantidad de antocianidinas equivalentes a malvidina 3 glucósido, no se observa diferencia significativa entre las muestras de freezer y las frescas.

Por ello el fruto del arándano se considera útil para extraer el pigmento mencionado y utilizarlo como aditivo natural en productos alimenticios, tendencia que en la actualidad ya se está poniendo en práctica en algunos países como Irlanda donde se comercializa como alimento funcional un yogur con agregado de extracto valorado de arándanos (www.glenisk.com/).

7. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC) y al Sr. Américo Hilario Muñoz la generosa donación de muestras de frutos. A la cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología-UNT que nos facilitaron el laboratorio y equipos para poder realizar este trabajo.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agilent Technologies, Inc. (2002). High-Efficiency and High-Speed Separation of Natural Anthocyanins.
- Barrit, B. H., & Torre, L. C. (1975). Fruit anthocyanin pigments of red raspberry cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100, 98–100.
- Bate – Smith, E.C.,(1948) “Paper chromatography of anthocyanin and related substances in petal extracts”, *Nature*, 161, 835
- Blank, F. (1947) The anthocyanin: pigments of plants. *The Botanical Review* 13 5: 241-317.
- Bohm, B.A. (1987). Intraspecific flavonoid variation. *The Botanical Review* 53 197-269.
- ChalkerScott, L., Fuchigami, L.H., Harber, R.M. (1989) Spectrophotometric measurement of leached phenolic compounds as an indicator of freeze damage. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 14(2): 31 5-31 9.
- Chen, L. F. y Luh, B.S.(1967), “Anthocyanins in Royalty grapes”, *J. Food Sci.*, 32, 66 – 74.
- Decker, E. A.(1997) Phenolics: prooxidants or antioxidants?. *Nutritional Reviews*. 1997; 55 (1): 396 - 398.

- Díaz, L.S. y Olave, F.,(1979) “Identificación espectrofotométrica de antocianos”, III Seminario y I congreso Latinoamericano de Ciencia y Tecnología en Alimentos, Noviembre, Buenos Aires,
- Francis, F.J., (1982). Analysis of anthocyanins. In: anthocyanins as food colors. Markakis, P., (Editor). Academic press. New York, USA. pp:181-197
- Gross, J. (1987). Pigments in fruits. Academic Press, Oxford, UK. pp: 59-85
- Harborne, J.B.,(1958) “Spectral methods of characterizing anthocyanins”, *Biochemical J.*, 70, 22 – 28.
- Harborne, J. B. (1967). Comparative Biochemistry of the Flavonoids. Academic Press, New York.
- Harborne, J.B. (1973). A chemotaxonomic survey of flavonoids and simple phenols in leaves of the Ericaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 66: 37-54.
- Hendry G. A.F. (1992) *Natural Food Colorants* (G. A. F. Hendry and J. D. Houghton, eds.). Blackie and Son Ltd. Glasgow. 79.
- Kalt W, Forney CF, Martin A, Prior RL.(1999) Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:4638-4644
- Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J. (1990). Fruit phenolics. CRC Press, Florida, USA. pp: 1-17, 39-81, 105-149
- Mancinelli, A.L. (1985) Light-dependent anthocyanin synthesis: a model system for the study of plant morphogenesis. *The botanical Review* 51 (1): 107- 153.
- Markakis P. (1982). Anthocyanins as food color, Academic Press, New York, 1-40
- Martínez, S. , González, J. , Culebras, J.M. y Tuñón M^a. J. (2002); Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes.
- McClure, J.W. (1975). Physiology and functions of flavonoids. p. 970-1 055. In: J.B. Harborne, T.J. Mabry and H. Mabry (ed). *The Flavonoids*. Chapman and Hall. London.
- Moore A. B., Francis F. J. and Clydesdale. (1982). *J. Food Protection*. 45:738.
- Nawar, W. W. (1993), Lípidos. En: Fennema, U. R. *Química de los alimentos*. (traducido del original en inglés por Calvo Rebollar, P.). Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España; p. 223 - 227.
- Quintero Hernández, C. M.(2004). Efecto de la copigmentación sobre el color y estabilidad del pigmento en un sistema modelo (bebida), usando antocianina de rábano.
- Smith, R.M. y Luh, B.S.(1965), “Anthocyanin pigments in the hybrid grape variety Rubired”, *J. Food Sci.*, 30, 995 – 1005.
- Somaatmadja, D. y Powers, J.J.(1963), “Anthocyanin pigments of Cabernet Sauvignon grapes”, *J Food Sci.*, 28, 617 – 622.
- Waterman, P. G., Mole, S.(1994) In analysis of phenolic plant metabolites. The methods in ecology series. Lawton, J. H., Likens, G. E., eds. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Woodhead, S. (1981). Environmental and biotic factors affecting the phenolic content of different cultivars of Sorghum bimbour. *Journal of Chemical* :1 035-1 047.
- Van Buren J. (1970). Fruit Phenolics. in *The Biochemistry of Fruits and their products*, Hulme, A.C. (Editor), Academic Press. London, UK. pp: 269-303
- Virachnee Lohachoompol, George Srzednicki, John Craske (2004) The Change of Total Anthocyanins in Blueberries and Their Antioxidant Effect After Drying and Freezing. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 5 248–252 • PII. S1110724304406123 • <http://jbb.hindawi.com>