OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE MANZANA MALAYA (*Syzygium malaccense*).

Autores: José A. Arencibia*, Daliannis Rodríguez, Alicia Casariego, Mario A. García. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Calle 222 No. 2317, CP 13600. La Habana, Cuba. *Tel.: +53 7 2716389; fax: +53 7 2603894 y E-mail: jarencibia1995@gmail.com.

RESUMEN

Se optimizó el proceso de extracción hidroalcohólica a partir de pulpa de manzana malaya (*Syzygium malaccense*) en función del rendimiento de extracción de antocianinas. El mayor ($p \leq 0,05$) rendimiento de extracción de antocianinas se correspondió con los mayores tiempo de extracción y porcentaje de etanol. Las condiciones óptimas de extracción fueron 90 % de etanol acidificado al 0,5 % con ácido cítrico, 24 h como tiempo de extracción y relación masa/disolvente de 1 g por cada 5 mL. El extracto optimizado presentó un valor de rendimiento de extracción de antocianinas (32 %) superior al estimado mediante la optimización numérica del proceso. El extracto optimizado presentó un color rosado tenue poco saturado y pudiera contener las antocianinas pelargonidina, cianidina, mecocianina, malvinidina, peonidina, petunidina y sus variantes glicosídicas.

Palabras clave: *Syzygium malaccense*, extracción hidroalcohólica, antocianinas.

ABSTRACT

The hydroalcoholic extraction process from pulp of Malay apple (*Syzygium malaccense*) was optimized according to the yield of extraction of anthocyanins. The biggest ($p \leq 0,05$) yield of extraction of anthocyanins corresponded with the biggest time of extraction and percentage of ethanol. The ideal extraction conditions were 90 % of ethanol acidified to 0,5 % with citric acid, 24 h as time of extraction and relation mass / dissolvent of 1 g for every 5 mL. The optimized extract presented a value of yield of extraction of anthocyanins (32 %) superior to the estimated by means of the numerical optimization of the process. The optimized extract presented a slightly saturated tenuous pink color and it could contain the antocianinas pelargonidin, cianidin, mecocianin, malvinidin, peonidin, petunidin and its glycosidics variants.

Key words: *Syzygium malaccense*, hydroalcoholic extraction, anthocyanins.

INTRODUCCIÓN

La elevada incidencia de enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, desnutrición, entre otras (Pandey y col., 2010; Shoji y Nakashima, 2004), así como la necesidad de hallar productos menos

contaminantes para el ambiente (Lobell y col., 2008) y la demanda de productos naturales menos procesados, con menores o nulos efectos secundarios sobre la salud (Mateus y Freitas, 2009), en conjunto con el develamiento de diversos compuestos fitoquímicos que tienen extenso potencial de explotación en la industria, han permitido el incremento y avance de investigaciones en el área nutracéutica y de los alimentos funcionales (Bhowmik y col., 2013).

En tales adelantos científicos se ha revelado que las plantas producen antocianinas, las cuales son metabolitos secundarios (flavonoides) con propiedades antioxidantes que pueden incidir prósperamente sobre la salud al disminuir la manifestación de enfermedades coronarias, así como por su actividad anticancerígena, efecto vasoprotector, antiinflamatorio, prevención de déficits de memoria, funciones neuroprotectoras, efectos citoprotectores, entre otros (Soto-Vaca y col., 2012); asimismo, pueden ser utilizadas como colorante natural en los alimentos y en la industria textil (Boo y col., 2012). Dichos efectos benéficos han promovido la exploración de especies que puedan ser utilizadas para la extracción de antocianinas (Yang y col., 2009).

La manzana malaya (*Syzygium malaccense*) es un fruto ovoide de 5 a 10 cm de largo y entre 2,5 y 7,5 cm de ancho, de piel delgada, lisa, cerosa y color rosa-rojo o purpura; la pulpa es blanca, crujiente o esponjosa, jugosa, de sabor muy suave y dulce (Elevitch y Wilkinson, 2000).

Considerando la presencia de compuestos fenólicos y antocianinas en la manzana malaya (Martins y col., 2014), se optimizó el proceso de extracción hidroalcohólica a partir de la pulpa de la manzana malaya para su posible uso como colorante natural en la industria alimentaria.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Recolección y procesamiento del material vegetal

Los frutos de manzana malaya se seleccionaron de forma que todos presentaran, de manera general, las mismas características de tamaño, color, ausencia de magulladuras, alteraciones morfológicas y desarrollo fúngico visible. Posteriormente, se separó la pulpa de la semilla y, tanto la pulpa como la piel, fueron triturados y homogenizados con un Ultra-Turrax IKA T25 digital (Mod. T25 D S25).

Diseño experimental

Se empleó el programa Design Expert 8.0.6 (Stad-Ease Inc., Minneapolis, EE.UU.) para el diseño experimental y procesamiento de los resultados, de forma tal que, el extracto optimizado, presentara el mayor rendimiento de extracción de antocianinas. Se utilizó el método de optimización numérica a

través de un diseño de superficie respuesta IV Óptimo para generar un modelo matemático que describiera las variaciones de las variables en cada extracto.

Los factores del diseño fueron el porcentaje de etanol (A), tiempo de extracción (B) y relación pulpa/disolvente (C), mientras que el rendimiento de extracción de antocianinas fue la variable de respuesta. El número total de combinaciones fue 8 corridas, entre las que se incluyó una réplica. La Tabla 1 muestra el intervalo evaluado para cada uno de los factores.

Tabla 1. Condiciones experimentales

Parámetro	Nomenclatura	UM	Tipo	Mínimo	Máximo
Etanol	A	%	Numérica	60	90
Tiempo de extracción	B	h	Numérica	6	24
Relación masa/disolvente*	C	-	Categórica	1	2

*1: 1 g por cada 10 mL; 2: 1 g por cada 5 mL.

Preparación de los extractos hidroalcohólicos de manzana malaya

Los extractos se obtuvieron por maceración a temperatura ambiente con agitación ocasional y adición de 0,5 % (m/v) de ácido cítrico para obtener una disolución hidroalcohólica acidificada. Al término del tiempo de extracción de cada una de las corridas, la mezcla resultante se filtró y se desechó el residuo sólido.

Determinación de antocianinas

El contenido de antocianinas se determinó según el método de pH diferencial propuesto por Lee y col. (2005) y se expresó como cianidina-3-glucósido con un coeficiente de extinción molar de 26900 L cm^{-1} mol^{-1} y masa molar de 449,2 g mol^{-1}. Se tomaron 0,2 mL del extracto hidroalcohólico y se mezclaron separadamente con 0,8 mL de disolución buffer de cloruro de potasio a 0,025 M a pH 1,0 y 0,8 mL de disolución buffer de acetato de sodio a 0,4 M a pH 4,5 (ambas ajustadas con HCl). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y se midieron las absorbancias a 510 y 700 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleígh UV-1601, Beijinng). El rendimiento de extracción de antocianinas (REA) se calculó a partir de la relación contenido de antocianinas del extracto/contenido de antocianinas de la pulpa empleada en la extracción.

Evaluación del extracto hidroalcohólico optimizado de la manzana malaya

Rendimiento de extracción de antocianinas

Se determinó según la metodología descrita anteriormente.

pH

Se determinó según la NC-ISO 1842 (2001), utilizando un pH-metro modelo Basic 20 (Crison, España). Las lecturas se realizaron por triplicado.

Sólidos totales

Se determinó por gravimetría indirecta por volatilización, mediante la separación del agua del producto por secado en termobalanza (Sartorius Mod. MA-40, Alemania) a 105 ºC hasta masa constante.

Índice de refracción

Se determinó por triplicado en un refractómetro de Abbe con corrección de temperatura.

Densidad

Se determinó según Alvarado (1990) mediante picnómetro de tubo capilar.

Determinación de polifenoles totales

La cuantificación de los polifenoles totales, se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Slinkard y Singlenton (1977). El ensayo consistió en añadir a 50 µL del extracto hidroalcohólico de manzana malaya 2,5 mL de la disolución diluida del reactivo Folin-Ciocalteu (1:9). Después de 5 min, se adicionaron 2 mL de Na_2CO_3 al 7,5 % (m/v) y se esperó 2 h. Transcurrido ese tiempo, se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleígh UV-1601, Beijinng).

Para la curva de calibración se utilizó como patrón el ácido gálico en concentraciones entre 100 y 500 mg/L. También se realizó un ensayo en blanco preparado con 50 µL de agua destilada bajo las mismas condiciones que la muestra para calibrar el equipo y eliminar las interferencias de las absorbancias producidas por los disolventes y reactivos empleados en la técnica.

Coordenadas cromáticas

La determinación del color del extracto optimizado se realizó mediante el método espectrofotométrico según las recomendaciones de la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE, por sus siglas en francés) (CIE, 1971). Se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleígh UV-1601, Beijinng) para obtener el espectro de transmitancia en la región visible entre 400 y 700 nm. Se realizó la transformación al espacio uniforme CIE L* a* b*, y se calcularon la luminosidad representada por L* y

los componentes del matiz por los valores a* y b* y cromaticidad (C*). Se empleó el iluminante D_{65} y un ángulo visual del observador normal de 10° (CIE LAB, 1978).

Determinación del espectro VIS

Se determinó el espectro de absorción entre 400 y 700 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleigh UV-1601, Beijing) del extracto hidroalcohólico optimizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efectividad del proceso de extracción

La Tabla 2 muestra el rendimiento de extracción de antocianinas de los extractos hidroalcohólicos para cada una de las condiciones ensayadas (Tabla 2).

Tabla 2. Rendimiento de polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos de manzana malaya

Corrida	Etanol (%)	Tiempo de extracción (h)	Relación masa/disolvente (m/v)	Rendimiento de antocianinas (%)
1	90	24	2	26,58361
2	90	15	1	17,84524
3	90	6	2	25,63608
4	60	6	2	17,47675
5	75	15	2	21,89858
6	60	24	1	12,68644
7	75	6	1	14,63415
8	75	15	2	22,42499

Se observa que el mayor ($p \leq 0,05$) rendimiento de extracción de antocianinas se corresponde con la corrida 1, lo cual puede relacionarse con que a esta corrida le correspondió los mayores tiempo de extracción y porcentaje de etanol, concentración propuesta por otros trabajos como la más adecuada para la extracción de constituyentes fitoquímicos, mientras que la corrida 6, con la menor concentración de etanol, presentó el menor valor para la variable de respuesta.

Influencia del porcentaje de etanol, tiempo de extracción y relación masa/disolvente sobre el rendimiento de antocianinas

La Tabla 3 muestra la significación del análisis de varianza de la regresión y de los coeficientes estimados para la variable respuesta rendimiento de antocianinas. Se observa que el modelo lineal resultó significativo para un nivel de confianza del 95,0 %, mostrando que existe una relación estadísticamente significativa de los factores sobre la variable dependiente del modelo. El estadígrafo R^2 indicó que el modelo ajustado explica el 99,1 % de la variabilidad en el rendimiento de antocianinas.

Tabla 3. Análisis de varianza para el contenido de antocianinas

Fuente	Valor p
Modelo	0,0001
A	0,0003
B	0,0590
C	0,0001
Falta de ajuste	0,3701

A: porcentaje de etanol; B: tiempo de extracción; C: relación masa/disolvente

De acuerdo a los valores de p, tanto el porcentaje de etanol como la relación masa/disolvente resultaron significativas ($p \leq 0,05$). La ecuación del modelo obtenido es:

$$RA = 18,65 + 3,53\ A + 0,75\ B + 3,60\ C \qquad \text{Ec. 1}$$

Al analizar los coeficientes se tiene que el término independiente tuvo mayor influencia sobre la variable respuesta. De acuerdo al signo de los coeficientes, el rendimiento de extracción de antocianinas aumenta con el aumento de los valores de todos los términos de la ecuación, siendo la relación masa/disolvente la variable de mayor incidencia. La influencia de estos factores sobre el rendimiento de extracción de antocianinas se mejor a través de la Fig. 1.

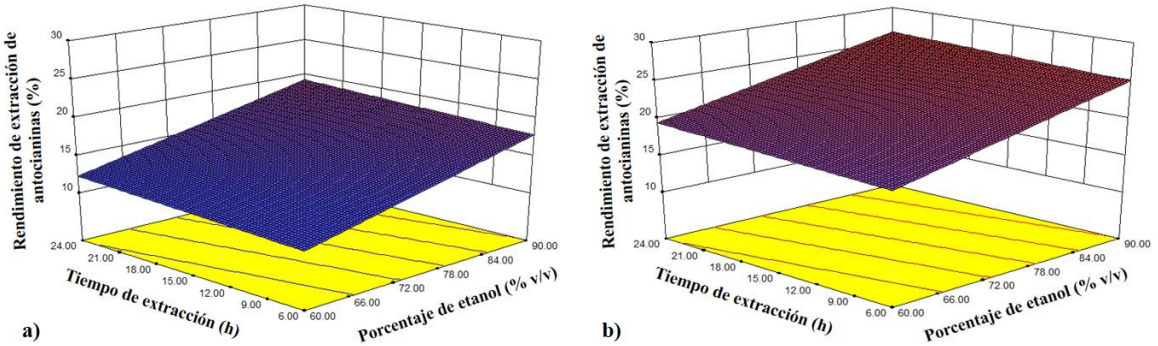

Fig. 1. Rendimiento de extracción de antocianinas en función del porcentaje de etanol, tiempo de extracción y relación masa/disolvente: a) 1 g / 10 mL; b) 1 g / 5 mL.

Para la optimización numérica del proceso de extracción se emplearon como restricciones los intervalos evaluados, de las variables independientes (porcentaje de etanol, tiempo de extracción y relación masa/disolvente) para obtener el mayor valor de rendimiento de extracción de antocianinas (Tabla 4).

Tabla 4. Restricciones para la optimización del proceso de extracción

Parámetro	Límite inferior	Límite superior	Criterio
Etanol (%)	60	90	En el intervalo
Tiempo de extracción (h)	6	24	En el intervalo
Relación masa/disolvente	1	2	En el intervalo
Rendimiento de extracción de antocianinas (%)	12,6864	26,5836	Maximizar

El modelo arrojó cinco soluciones optimizadas (Tabla 5) para el proceso de extracción en función de las restricciones anteriores. Se seleccionó la solución 1 porque presentó el mayor rendimiento de extracción de antocianinas, además de la mayor conveniencia estadística.

Tabla 5. Soluciones optimizadas que cumplen con las restricciones

Parámetro	Solución				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
Etanol (%)	90	90	90	90	89,23
Tiempo de extracción (h)	24	20,41	24	23,69	24
Relación masa/disolvente	2	2	1	1	1
Rendimiento de extracción de antocianinas (%)	26,5337	26,2331	19,3402	19,3141	19,1595
Conveniencia estadística	0,996	0,975	0,479	0,477	0,466

En la Tabla 6 se observa que el rendimiento de extracción de antocianinas en el extracto optimizado (32 %) resultó superior al estimado por la optimización numérica (26,53 %).

Tabla 6. Caracterización del extracto optimizado

Parámetro	Media (Desviación estándar)
Rendimiento de antocianinas (%)	32 (1)
Polifenoles totales (mg/100 mL)	167 (3)
pH	3,65 (0,006)
Densidad	23,896 (0,005)
Índice de refracción	1,3583 (0,0001)
Sólidos totales	1,13 (0,05)
L*	89,255 (0,1)
a*	10,3 (0,2)
b*	0,5 (0,2)
C*	10,312 (0,2)

Sarradé y col. (2016) optimizaron el proceso de extracción de antocianinas a partir de mortiño (*Vaccinium floribundun, Kunt,*), evaluaron tiempo de maceración (4, 14 y 24 h), temperatura de extracción (2, 25 y 62 ºC) y tipo de solvente (metanol, etanol y éter) acidificado con ácido cítrico al 0,02 %. Se determinó que las condiciones óptimas para la extracción de antocianinas fueron etanol a 2 ºC durante 24 h.

Heras y col. (2013) optimizaron el proceso de extracción de antocianinas mediante un modelo superficie de respuesta, evaluaron como factores porcentaje de etanol acidificado al 1 % con ácido ortofosfórico (50 – 90 %), temperatura de extracción (30 y 60 ºC) y tiempo de extracción (4 a 12 h). El proceso de extracción de antocianinas se ajustó a un modelo cuadrático y las condiciones de extracción fueron etanol 50 %, a 30 ºC y 4 horas.

Por otra parte, la extracción de antocianinas a partir de frutos de *Arbutus unedo* L. resultó más efectiva cuando se realizó a 90 ºC con 80 % de etanol acidificado al 0,05 % con ácido clorhídrico durante 5 min, con un rendimiento de extracción de 60, 9 % (Jiménez, 2017).

El valor de polifenoles totales para el extracto optimizado se muestra en la Tabla 6, y se relaciona con la presencia de antocianinas en el extracto.

El índice de refracción puede emplearse como parámetro de calidad, al dar criterio indirecto de la concentración del extracto en relación a su contenido de sólidos totales, y por tanto su densidad. En este sentido, la densidad del extracto hidroalcohólico optimizado se correspondió con su bajo contenido de sólidos totales; debe tenerse en cuenta que se trata de un extracto diluido que requiere de una etapa de concentración para su empleo en la obtención de un colorante natural.

El valor de pH del extracto optimizado (3,65) se relaciona con la estabilidad de las antocianinas, de forma que a valores de pH inferiores a 2, prácticamente el 100 % de los pigmentos se encuentra en su forma más estable; mientras que a valores cercanos 6 se tiene una chalcona incolora e inestable (Hutchings, 1999).

La evaluación del color (Tabla 6) permitió determinar que el color del extracto hidroalcohólico optimizado de pulpa de manzana malaya se debió principalmente a la contribución roja relacionada con el valor positivo de la componente a* y en menor medida a la contribución amarilla vinculada al valor positivo de b*; la combinación de estos con la luminosidad arrojó como resultado un color rosado tenue poco saturado, relacionado con el valor de cromaticidad.

Las antocianinas presentan bandas de absorción características en la región ultravioleta (250 y 370 nm) y visible (500 a 545 nm). La absorción en esta última banda varía con el pH del medio, lo que permite detectar el tipo de antocianina presente (Ortega y Guerra, 2006).

La Fig. 2 muestra el espectro visible del extracto hidroalcohólico optimizado, se pudo observar un pico bien definido entre 460 y 530 nm, similar al espectro UV-Vis reportado por Giusti y Wrolstad (2001) y Zapata y col. (2014) para las antocianinas.

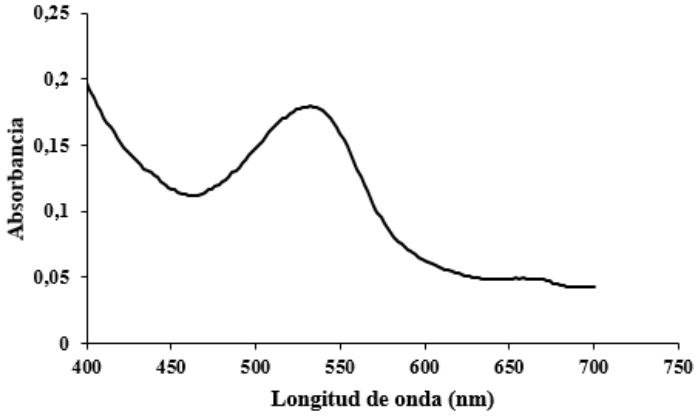

Fig. 2. Espectro visible del extracto hidroalcohólico optimizado.

En este extracto hidroalcohólico optimizado por la forma del espectro de absorción pudieran encontrarse las antocianinas pelargonidina (530 nm), pelargonidina 3 - glucósido (515 nm), pelargonidina 3 - 5 glucósido (505 nm), cianidina 3 - glucósido (522 nm), cianidina 3,5 - glucósido (522 nm), mecocianina (523 nm), malvinidina 3,5 - diglucósido (520 nm), Delfinidina (508nm), Peonidina (506 nm), Petunidina (508 nm).

CONCLUSIONES

El mayor ($p \leq 0,05$) rendimiento de extracción de antocianinas se correspondió con los mayores tiempo de extracción y porcentaje de etanol. Las condiciones óptimas de extracción fueron 90 % de etanol acidificado al 0,5 % con ácido cítrico, 24 h como tiempo de extracción y relación masa/disolvente 1 g por cada 5 mL. El extracto optimizado presentó un valor de rendimiento de extracción de antocianinas (32 %) superior al estimado mediante la optimización numérica del proceso. El extracto optimizado presentó un color rosado tenue poco saturado y pudiera contener las antocianinas pelargonidina, cianidina, mecocianina, malvinidina y sus variantes glicosídicas.

REFERENCIAS

Alvarado, J. (1990). Proyecto Multinacional de Biotecnología y Alimentos. Uso de parámetros reológicos como índices de control en procesos enzimáticos. Ambato: Organización de los Estados Americanos. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.

Bhowmik, D.; Gopinath, H.; Kumar, B.P.; Duraivel, S.; Kumar, K.P.S. (2013). Nutraceutical - A bright scope and opportunity of Indian healthcare market. The Pharma Innovation, 1, 29-41.

Boo, H.O.; Hwang, S.J.; Bae, C.S.; Park, S.H.; Heo, B.G.; Gorinstein, S. (2012). Extraction and characterization of some natural plant pigments. Industrial Crops and Products, 40, 129-135.

CIE. Commission International de l'Eclairage. (1978). Recommendations on uniform color spaces, color difference equations, psychometric color terms, Supplement No. 2 to CIE Publication No. 15, Colorimetry, Bureau Central de la CIE, Paris, France.

CIE. International Commission on Illumination. (1971*). Colorimetry: Official Recommendations of the International Commission on Illumination.* Bureau Central de la CIE, París, Francia.

Elevitch, C. R.; Wilkinson, K. M. (2000). Agroforestry Guides for Pacific Islands. Hawai.

Giusti, M.; Wrolstad, R. (2001). Anthocyanins. Characterization and measurement with UV visible spectroscopy. In Current Protocols in Food Analytical Chemistry; Wrolstad, R. E., Ed.; Wiley: New York, Unit F1.2, 1-13.

Heras, I.; Alvis, A.; Guillermo, A. (2013). Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (*Solana melonera* L.). Información Tecnológica, 24:5, 93-102.

Hutchings, J. (1999). Food color and appearance. Aspen Publishers. Washington, D.C. E.U.A.

Jiménez, C. (2017). Desarrollo de un aditivo colorante natural a base de cianidina obtenido a partir de frutos de *Arbutus unedo* L.: optimización de la extracción y estudio de su aplicación en gofres. Tesis en opción al título académico Máster en Farmacia y Química de Productos Naturales. Instituto Politécnico de Bragança. Universidad de Salamanca.

Lee, J.; Durst, R.; Wrolstad, R. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. J AOAC Int.

Lobell, D.B.; Burke, M.B.; Tebaldi, C.; Mastrandrea, M.D.; Falcon, W.P.; Naylor, R.L. (2008). Prioritizing climate change adaptation needs for food security in 2030. Science, 319, 607-610.

Martins, V.C; Godoy, R.L.O.; Borguini, R.G, Santiago, M.C.P.A.; Gouvêa, A.C.M.S.; Pacheco, S.; Nascimento, L.S.M.; Torquilho, H.S. (2014). Estudo da estabilidade das antocianinas majoritárias do fruto do Jambo Vermelho (*Syzygium malaccense* L. Merryl & Perry). 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Mateus, N.; Freitas, V. (2009). Anthocyanins as food colorants. In: Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications. K. Gould, K. Davies and C. Winefield (eds.). Springer. New York, 283-304.

NC-ISO 1842 (2001). Productos de Frutas y vegetales. Determinación de pH.

Ortega, G.M.; Guerra, M. (2006). Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químicofísicos. Parte II. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 40:3, 3-11.

Pandey, M.; Verma, R.K.; Saraf, S.A. (2010). Nutraceuticals: new era of medicine and health. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 3, 11-15.

Sarradé, F.E.; Moncayo, P.S. (2016). Optimización de la técnica y métodos de extracción de antocianinas del Mortiño (*Vaccinium floribundum, Kunt*), para aplicaciones industriales. Tesis en opción al título académico de Ingeniero Agroindustrial y de Alimentos. Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias. UDLA.

Shoji, Y.; Nakashima, H. (2004). Nutraceutics and delivery systems. Journal of Drug Targeting, 12, 385-391.

Slinkard, K.; Singlenton, V.L. (1997). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am.J. Enol.Vitic, 28, 49-55.

Soto-Vaca, A.; Gutiérrez, A.; Losso, J.N.; Xu, Z.; Finley, J.W. (2012). Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 6658-6677.

Yang, Z.; Chen, Z.; Yuan, S.; Zhai, W.; Piao, X. (2009). Extraction and identification of anthocyanin from purple corn (*Zea mays* L.). International Journal of Food Science and Technology, 44, 2485-2492.

Zapata, L.M.; Heredia, A.M.; Quinteros, C.F.; Malleret, A.D.; Clemente, G.; Cárcel, J.A. (2014). Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. Ciencia, Docencia y Tecnología, 25:40, 166-193.