

## EL IMPACTO DE LA ESTRUCTURA Y ALGUNOS PARAMETROS FISICOQUÍMICOS EN LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO PECTINA-POLIFENOL

Rivera Beltrán Alexis \*, Villanueva Rodríguez Socorro Josefina, Padilla Camberos Eduardo, Urías Silva Judith Esmeralda

Centro de Investigación y Atención Tecnológica del Estado de Jalisco, Unidad de Tecnología Alimentaria, Av. Normalistas No. 800 Colinas de la Normal, C.P. 44270, Guadalajara, Jalisco, México. \* [alex.riba8902@gmail.com](mailto:alex.riba8902@gmail.com)

### RESUMEN

En este trabajo se pone en evidencia el efecto de la estructura del polifenol y de la pectina en la formación del complejo pectina-polifenol en un sistema de soluciones modelo que simulan una bebida funcional a base de extractos acuosos de semilla de aguacate y de nopal, además se probó el impacto del acidificante, pH y la presencia de iones en las interacciones. Se utilizó pectina de alto (PA) y bajo metoxilo (PB), Procianidina B2, (+)- Catequina y Ácido Clorogénico; como medio acidificante Ácido Málico y Cítrico, dos niveles de pH: 3 y 4, y como fuente de iones 0.01M de KCl. Se determinó que es posible favorecer o no las interacciones pectina-polifenol al manipular el pH y la presencia de iones. Los polifenoles estudiados forman interacciones con PA y PB, pero dependiendo del medio en donde se encuentren se favorecerá la interacción con una u otra. Se determinó que los polifenoles estudiados tienen mayor afinidad por las soluciones más complejas de PA, y que la complejación entre los polifenoles y ésta pectina parece ser favorecida por interacciones hidrófobas. Se probó que es posible entender el mecanismo de interacción pectina-polifenol usando parámetros fisicoquímicos capaces de inhibir o fomentar las interacciones.

### ABSTRACT

This paper demonstrates the effect of the structure of the polyphenol and the pectin in the formation of the complex pectin-polyphenol in a model solutions system that simulating a functional beverage of aqueous extracts of avocado seed and nopal, moreover was tested the impact of the acidifier medium, pH and the presence of ions in the interaction. High (PA) and low methoxyl degree pectin (PB), Procyanidin B2, (+)-Catechin and chlorogenic acid was used; malic acid and citric as acidifying, pH 3 and 4, and as a source of ions 0.01M KCl. It was determined that can facilitate or not the interactions pectin-polyphenol when manipulate the pH and presence of ions, all the polyphenols studied interact with PA and PB, but depending on the environment the interaction with one or another can be favoring. It was determined that the polyphenols studied have greater affinity for the more complex solutions of PA, and complexation between polyphenol and pectin it seems favored by hydrophobic interactions. It is also proved that it is possible to understand the mechanism of pectin-polyphenol interaction using physicochemical parameters capable of inhibiting or promoting interactions.

**Palabras clave:** Interacciones Pectina y Polifenol.

**Área:** Alimentos funcionales.

### INTRODUCCIÓN

En México, los alimentos funcionales elaborados con alto contenido de polifenoles (PF) y fibra dietética como la pectina, son de gran importancia, debido a que se ha probado que estos compuestos tienen un gran impacto sobre diversos padecimientos, como la hiperglucemia e hipercolesterolemia (Jiménez et al. 2013, Quiñones et al. 2013). Por otro lado la semilla de aguacate ha demostrado ser una fuente de PF como Catequinas, procianidinas, antocianinas, taninos, etc. (Ramos et al. 2013, Kosińska et al. 2012), y el nopal como una fuente de pectina. Sin embargo el principal reto en la formulación de alimentos funcionales es garantizar el efecto biológico de los compuestos nutraceuticos, aun cuando forman parte de una matriz alimentaria, ya que las interacciones dentro de dicha matriz pueden favorecer la protección y el transporte de los nutraceuticos o dificultar su respuesta nutricional in vivo (Michalski et al. 2013, Landete 2012). Hasta ahora se sabe que cuando la pectina y los PF entran en contacto se forma rápidamente el complejo pectina-polifenol, que dicho complejo se mantiene unido mediante interacciones no covalentes, como lo son los puentes de hidrógeno, interacciones iónicas e interacciones hidrofóbicas; este tipo de interacciones son de naturaleza distinta y para que una u otra impere depende de factores estructurales (unidades conformacionales, grupos funcionales y estequiometría), el grado de polimerización y del medio, entre otras (Watrelet et al. 2013, Buchweitz et al. 2013, Le Bourvellec and Renard 2012).

El objetivo de este trabajo es utilizar un sistema de soluciones modelo para poner en evidencia, en un sistema controlado, el efecto de la estructura tanto del polifenol como de la pectina en la formación del complejo pectina-polifenol, además, se desea conocer el efecto del medio acidificante, el pH y la presencia de iones en las interacciones. Para el diseño de dichas soluciones se utilizarán los datos de un alimento funcional compuesto de extractos polifenólicos acuosos de semilla de aguacate Hass (*Persea americana* Mill c.v. Hass) y extracto acuoso con pectina de nopal (*Opuntia ficus-indica*) desarrollado en un trabajo previo en el Centro de Investigación y Atención Tecnológica del Estado de Jalisco y el cual tiene una patente en trámite.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Solventes y reactivos

Agua, Metanol y Ácido acético grado HPLC, Ácido Clorogénico (AC), Procianidina B2 (Pr), (+)-Catequina (C), pectina de naturaleza cítrica de alto grado de metoxilo (PA) ( $\geq 85\%$ ) y de bajo grado de metoxilo (PB) (34%), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), se obtuvieron de los laboratorios de SIGMA-ALDRICH, el Ácido Cítrico y Málico y KCl del laboratorio FERMONT.

### Diseño del sistema de soluciones modelo.

La concentración de los polifenoles fue de 25ppm de AC, C y Pr, 0.003gr/ml de PA o PB, se ajustó el pH a 3 y 4 usando ácido málico o cítrico, y 0.01M de KCl. Todas ellas con agua desionizada. Posteriormente cada solución se agitó y se mantuvo en reposo en la oscuridad 20 minutos antes de las mediciones.

### **Determinación del % de Inhibición del radical DPPH.**

Esta determinación se realizó con base en la técnica reportada por (Rodríguez et al. 2011). El ensayo se realizó por triplicado. Las muestras se dejaron reposar 20 minutos en la oscuridad y posteriormente se leyeron en un espectrofotómetro de microplaca xMark a 217nm. Como línea base se utilizó una solución con los componentes no polifenólicos. Los resultados se reportan usando la siguiente ecuación:  $\%I = ((\text{Blanco} - \text{Muestra}) / \text{Blanco}) \times 100$ .

### **Cuantificación de polifenoles libres.**

La cuantificación se realizó mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) en un equipo VARIAN ProStar con detector de UV, una columna Whatman C-18 de 4.6mm x 250mm. La elución se llevó a cabo mediante gradiente, iniciando con 85% agua acidificada y 15% metanol acidificado y termina a 40% de agua acidificada y 60% de metanol acidificado, cada uno al 1% de ácido acético. Se mantuvo flujo constante a 0.4ml/min durante 50 minutos.

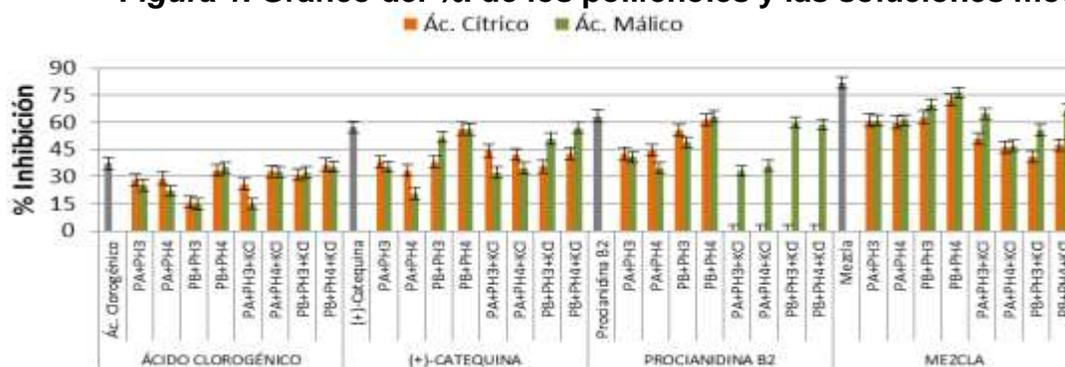
### **Método estadístico.**

Los resultados fueron analizados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) con el software STATGRAPHICS Centurion XVI. Se analizaron los valores obtenidos de las variables de respuesta del %I del radical DPPH y la cuantificación del perfil polifenólico.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El resultado de este trabajo indica que, los polifenoles ensayados, la afinidad de éstos por PA o por PB se ve influenciada por el pH y por la presencia de iones en el medio. Se observó que, tanto las soluciones de ácido cítrico y las de ácido málico tienen el mismo comportamiento, excepto en las soluciones de procianidina; además que el efecto del pH y la presencia de iones afecta de forma distinta al %I de los polifenoles y a la pectina, esto se puede deber al tipo de grupos funcionales que presenten. También se observó, mediante la determinación del perfil de polifenoles, que existe competencia entre los polifenoles por los sitios activos de la pectina, siendo la Procianidina B2 (Pr) la más afín a la pectina debido a que tienen mayor número de puntos de unión, seguida por la (+)-Catequina (C) y el Ácido Clorogénico (AC). En la Figura 1 se observan las soluciones con los distintos grados de complejidad y composición y en la Figura 2 uno de los resultados de la determinación del perfil polifenólico de dichas soluciones en ácido cítrico; ambas pruebas, evidencian o reflejan el mismo comportamiento. El análisis individual de cada polifenol, ayudó a conocer el impacto del medio sobre cada uno de ellos y posteriormente, ayudó a conocer su comportamiento en una matriz más compleja junto a otros polifenoles, y así proponer cambios en la formulación de la bebida funcional, esto en función de un posterior ensayo biológico para determinar el impacto de las interacciones en el efecto biológico de la bebida de semilla de aguacate y nopal. Se determinó, en el caso de las soluciones con la mezcla de polifenoles, que para fomentar la interacción es necesario utilizar ácido cítrico, PB, pH3 y KCl, y para disminuir la interacción, PB a pH4 independientemente del tipo de ácido.

**Figura 1. Gráfico del % de los polifenoles y las soluciones modelo.**



PB pectina de bajo metoxilo, PH3 solución a pH3, PH4 solución a pH4, KCl presencia de iones.

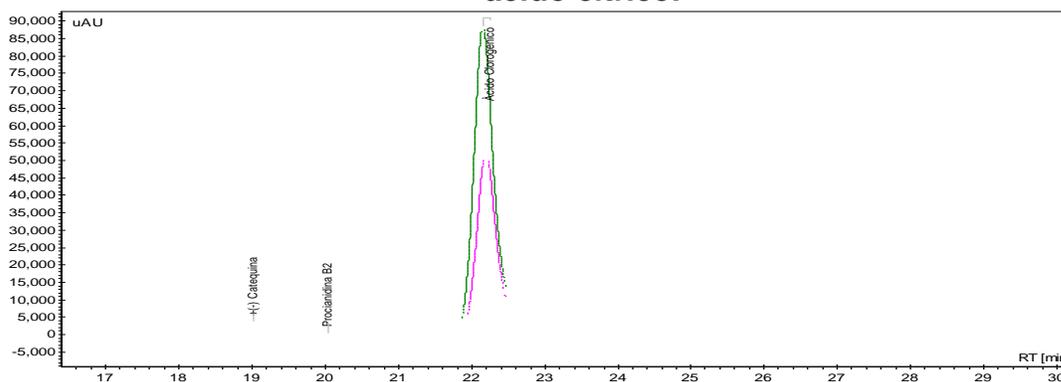
El impacto del pH en las soluciones radica en que, puede generar la polarización del grupo carboxilo del ácido galacturónico y de AC, generando interacciones iónicas, ya sea de atracción o repulsión; esto se observa en las soluciones de AC+PB+PH4 y AC+PB+PH3, en donde la solución a pH3 mostró mayor interacción que la solución a pH4, esto se debe a que AC con un pKa de 4.3 y la parte lineal de la cadena de ácido galacturónico de homogalacturano de PB con un pKa de 2.9 son ácidos débiles, especialmente susceptibles a los cambios de pH. En el caso de la solución a pH4, los grupos carboxilo de PB y AC se encuentran ionizados con carga negativa (COO<sup>-</sup>), lo que genera la repulsión entre estos compuestos, esto concuerda con lo observado por [Padayachee et al. 2012](#). En el caso de las soluciones a pH3, AC no presenta ionización y PB si, lo que favorece la interacción iónica con PB.

Por otro lado, a pesar de que PA tiene pocos grupos capaces de ionizarse, si es afectada por el pH, ya que se sabe que esta pectina puede generar interacciones hidrófobas a pH de 2 a 3.5. Además, en el caso de C y Pr, no se encontró evidencia de que a pH 3 o 4 se favorezca la deprotonación de sus grupos hidroxilo y la generación de la carga negativa, lo que afirma con lo expuesto por [Muzolf-Panek et al. 2012](#). Es por ello que se plantea la idea de que las interacciones entre PA, C y Pr se mantienen principalmente por interacciones hidrófobas, ya que al variar el pH aumentaba la interacción de las soluciones entre los compuestos de las soluciones.

Se observó también que las interacciones entre C y PA, y principalmente en el caso de las soluciones de Pr y PA en ácido cítrico, se incrementó la interacción bajo la presencia de KCl, lo que sostiene la teoría de las interacciones hidrofóbicas entre estos compuestos, esto se debe a que los iones cambian la polaridad de la superficie de la capa de solvatación de agua que se forma alrededor de las fracciones no polares de las moléculas en solución, formando complejos de hidratación fuertes con la capa de solvatación, aumentando así su distancia de las superficies hidrófobas generando estabilidad al aumentar la entropía del sistema. Además, debido a la habilidad quelante de metales de Pr, es posible que bajo la presencia de KCl en las soluciones de ácido cítrico se forme un puente salino entre las unidades libres de Pr y las que están unidas con la pectina lo que genera una red de interacciones mucho más fuerte que cuando no

hay KCl, esto explicaría el hecho que no pudo determinar la cantidad de Pr en solución o su %I. Por otro lado tenemos las soluciones de ácido málico, este ácido también tienen habilidad para quelar metales, lo que puede romper la interacción Pr-Pr; por lo que en estas soluciones sí se obtuvo señal tanto para la determinación de procianidina como para %I. Por otro lado, en el caso de las soluciones de AC y C de PB a pH4 con presencia de iones, presentaron menor interacción, esto se puede deber a que PB al tener todos sus grupos ionizados (COO-) generan puentes salinos con los cationes de potasio (K++), por lo que las cadenas de pectina interaccionan entre si y dejan libres a los polifenoles.

**Figura 2. Cromatograma de soluciones modelo con la mezcla de polifenoles en ácido cítrico.**



Verde, solución de PB a pH4, Rosa, PB a pH3, Rojo PA a PH4 y Negro PA a pH3.

## BIBLIOGRAFÍA

- Le Bourvellec, C, and C M G C Renard. 2012. "Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms." *Critical reviews in food science and nutrition* 52(3): 213–48.
- Buchweitz, M, M Speth, D R Kammerer, and R Carle. 2013. "Impact of Pectin Type on the Storage Stability of Black Currant (*Ribes Nigrum* L.) Anthocyanins in Pectic Model Solutions." *Food chemistry* 139(1-4): 1168–78.
- Jiménez-Arellanes, Adelina, Julieta Luna-Herrera, Ricardo Ruiz-Nicolás, Jorge Cornejo-Garrido, and Lilián Yépez-Mulia. 2013. "Antiprotozoal and Antimycobacterial Activities of *Persea Americana* Seeds." *BMC complementary and alternative medicine* 13(1): 109.
- Kosińska, Agnieszka, Magdalena Karamać, Isabel Estrella, Teresa Hernández, Begoña Bartolomé, and Gary a Dykes. 2012. "Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of *Persea Americana* Mill. Peels and Seeds of Two Varieties." *Journal of agricultural and food chemistry* 60(18): 4613–19.
- Landete, J M. 2012. "Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health." *Critical reviews in food science and nutrition* 52(10): 936–48.
- Michalski, M C, C Genot, C Gayet, C Lopez, F Fine, F Joffre, J L Vendeuvre, J Bouvier, J M Chardigny, and K Raynal-Ljutovac. 2013. "Multiscale Structures of Lipids in Foods as

Parameters Affecting Fatty Acid Bioavailability and Lipid Metabolism.” *Progress in lipid research* 52(4): 354–73.

- Muzolf-Panek, Małgorzata, Anna Gliszczyńska-Świąło, Henryk Szymusiak, and Bożena Tyrakowska. 2012. “The Influence of Stereochemistry on the Antioxidant Properties of Catechin Epimers.” *European Food Research and Technology* 235(6): 1001–9.

- Padayachee, A, G Netzel, M Netzel, L Day, D Zabarar, D Mikkelsen, and M J Gidley. 2012a. “Binding of Polyphenols to Plant Cell Wall Analogues - Part 2: Phenolic Acids.” *Food chemistry* 135(4): 2287–92.

- Quiñones, Mar, Marta Miguel, and Amaya Aleixandre. 2013. “Beneficial Effects of Polyphenols on Cardiovascular Disease.” *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society* 68(1): 125–31.

- Ramos-jerz, Maria R, Socorro Villanueva, Gerold Jerz, Peter Winterhalter, and Alexandra M Deters. 2013. “Persea Americana Mill . Seed: Fractionation , Characterization , and Effects on Human Keratinocytes and Fibroblasts.” 2013.

- Rodríguez-Carpena, Javier-Germán, David Morcuende, María-Jesús Andrade, Petri Kylli, and Mario Estévez. 2011. “Avocado (Persea Americana Mill.) Phenolics, in Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities, and Inhibition of Lipid and Protein Oxidation in Porcine Patties.” *Journal of agricultural and food chemistry* 59(10): 5625–35.

- Watrelot, Aude a, Carine Le Bourvellec, Anne Imberty, and Catherine M G C Renard. 2013. “Interactions between Pectic Compounds and Procyanidins Are Influenced by Methylation Degree and Chain Length.” *Biomacromolecules* 14(3): 709–18.