

ESTABILIDAD DEL COLOR DEL EXTRACTO ACUOSO DE JUSTICIA SECUNDA BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE PREPARACION O ALMACENAMIENTO DE ALIMENTOS.

(COLOR STABILITY OF THE AQUEOUS EXTRACT OF JUSTICE SECUNDA WITH THE ADDITION OF CITRIC ACID, LIGHT, OXYGEN, SUCROSE AND SODIUM CHLORIDE)

Rafael Barreto-Méndez.

Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales “Ezequiel Zamora” UNELLEZ. Programa Estudios Avanzados. San Carlos-Estado Cojedes, Venezuela.

rafael@barretomendez.com

Recibido: 04-11-2021 / Aceptado: 01-06-2022

RESUMEN

Se evaluó la estabilidad del color extracto acuoso de *Justicia secunda* bajo diferentes condiciones utilizadas comúnmente en la preparación o conservación de alimentos. Para cada condición se determinaron los cambios de color medidos por CIE ΔE^* (Conocido como Delta E, que se define como la diferencia entre dos colores en un espacio de color $L^*a^*b^*$). Los factores experimentales utilizados son: Aire, luz como formas de almacenamiento y los ingredientes de preparación: Azúcar, sal y ácido cítrico. Como respuesta, se encontró que, de todos los factores probados, solo el ácido cítrico provoca un cambio notorio de color al afectar el pH según la siguiente ecuación: $pH = pH_i - 82,74 \times \text{Ácido Cítrico (g)}$ y solo tolera descensos de pH de 6,5 a 6,0, siendo los cambios muy notorios a simple vista al descender de este valor. En relación con los demás ingredientes y factores estudiados, ninguno de estos o sus interacciones tienen un efecto estadísticamente significativo sobre ΔE con un 95,0% de nivel de confianza.

Palabras Clave: Estabilidad del color, aditivo alimentario, colorante natural, Justicia secunda Vahl.

ABSTRACT

The stability of the color aqueous extract of *Justicia secunda* was evaluated under different conditions commonly used in the preparation or preservation of food. For each condition, the color changes measured by CIE ΔE^* (known as Delta E, which is defined as the difference between two colors in an $L^*a^*b^*$ color space) were determined. The experimental factors used are: Air, light as forms of storage and the preparation ingredients: Sugar, salt and citric acid. In response, it was found that, of all the factors tested, only citric acid causes a noticeable change in color by affecting the pH according to the following equation: $pH = pH_i - 82.74 \times \text{Citric Acid (g)}$ and only tolerates decreases in pH from 6.5 to 6.0, the changes being very noticeable to the naked eye when descending from this value. In relation to the other ingredients and factors studied, none of these or their interactions have a statistically significant effect on ΔE with a 95.0% confidence level. **Keywords:** Color stability, food additive, natural colorant, *Justicia secunda* Vahl.

INTRODUCCIÓN

El color está asociado al sabor o al aroma del alimento y viceversa. Un sabor a limón debe darse a un alimento de color amarillo, un sabor a frambuesa debe dársele a un color rojo oscuro” (De Saint Blanquat, 2000). Se señala que, incluso el color está asociado a otras características tales como el dulzor, el salado e interfiere en el juicio sobre la intensidad del sabor o la identificación de un alimento y de acuerdo con el color, se ve afectada la aceptación de un alimento (Ihl et al, 1994).

Debido al hecho de que las fuentes de colorantes rojos naturales existentes presentan cambios de color a variaciones de pH tal como sucede con las antocianinas, extraídas principalmente a partir de la vid (*Vitis vinifera L.*), arándanos (*Vaccinium myrtillus L.*) y las flores de Karkadé (*Hibiscus sabdariffa L.*) (Carrubba, A y Calabrese, 1998; Carrubba et al, 2000), amerita que todo colorante nuevo propuesto para ser usado en la industria alimentaria, sea probado en diferentes condiciones de preparación de alimentos y bebidas.

Un requisito indispensable para que un colorante natural pueda ser usado en la industria de los alimentos, este debe mantener su color en las condiciones de preparación del alimento al cual está destinado a impartirlo.

Habida cuenta de lo anterior, el presente trabajo somete al colorante natural comprobadamente inocuo y obtenido a partir de hoja verdes, maduras del arbusto *Justicia secunda* (Vahl.) que es una planta de la familia *Acanthaceae* distribuida ampliamente en América Central y usada en medicina tradicional con diversos fines. Es un pequeño arbusto perenne de 0,5-1 m de altura, con flores rojo-violeta, Barreto, 2008) a algunas condiciones de preparación y/o almacenamiento para comprobar que es un colorante seguro, estable, reproducible y eficaz para satisfacer las necesidades de la industria (De Saint Blanquat, 2008).

El objetivo de esta investigación es evaluar si la estabilidad del color se ve o no afectada con la adición de ácido cítrico, sacarosa y cloruro de sodio, almacenado con y sin aire y con o sin luz.

METODOLOGÍA

Se procedió a medir el efecto del pH con un Medidor de pH marca OAKTON serie 500 en nueve muestras extraídas según Barreto (2008). Posteriormente, se utilizó un diseño factorial de 3 factores experimentales, con dos niveles de experimentación y 3 bloques o repeticiones para determinar el efecto de los distintos factores sobre el cambio de color según se muestra a continuación en la tabla 1:

Tabla 1. Diseño factorial de 3 factores experimentales, con dos niveles de experimentación y 3 bloques o repeticiones.

Aire	Luz	Ingrediente
0	0	Testigo
1	0	Testigo
0	1	Testigo
1	1	Testigo
0	0	NaCl
1	0	NaCl
0	1	NaCl
1	1	NaCl
0	0	Azúcar
1	0	Azúcar
0	1	Azúcar

Tabla 1. (Cont.)

Aire	Luz	Ingrediente
1	1	Azúcar
0	0	Testigo
1	0	Testigo
0	1	Testigo
1	1	Testigo
0	0	NaCl
1	0	NaCl
0	1	NaCl
1	1	NaCl
0	0	Azúcar
1	0	Azúcar
0	1	Azúcar
1	1	Azúcar
0	0	Testigo
1	0	Testigo
0	1	Testigo
1	1	Testigo
0	0	NaCl
1	0	NaCl
0	1	NaCl
1	1	NaCl
0	0	Azúcar
1	0	Azúcar
0	1	Azúcar
1	1	Azúcar

Se midió el efecto que tiene el pH del extracto acuoso de la planta *J. secunda* en el color del extracto acuoso utilizando los parámetros CIE 1976 (Modelo cromático usado normalmente para describir todos los colores que puede percibir el ojo humano y en lo sucesivo, CIE) L^* a^* b^* C^* Hue a^*b^* y así poder determinar el valor ΔE^* .

La extracción se realizó siguiendo la metodología descrita por Barreto (2008) en cuanto a cantidad de hojas por cantidad agua para lograr la optimización de la extracción del extracto acuoso.

Para cada condición se determinaron los cambios en los parámetros de color CIE L^* a^* b^* según los diferentes ingredientes de preparación y según las diferentes condiciones durante el tiempo de almacenamiento.

- El efecto del Ácido Cítrico sobre el pH.
- Se midió el efecto que tiene el pH del extracto acuoso de la planta J. secunda en el color de este utilizando los parámetros CIE L* a* b* C* Hue a*b*.
- Sal [NaCl] y Sacarosa.
- Exposición al aire [O²].
- Exposición a la luz.

Para demostrar el efecto que tiene el pH del extracto acuoso de la planta J. secunda (Sangría) en el color de dicho extracto, se realizó una extracción siguiendo el protocolo habitual descrito por Barreto (2008). Para medir el color de la muestra del extracto acuoso de J. secunda, se utilizaron los parámetros tristímulus CIE L* a* b* Chroma y Hue a*b*, así como el espectro de absorbancia. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando StatSoft, Inc. (2001) y STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

Comprobado que el ácido cítrico provoca un descenso bien definido por la ecuación 1 y un coeficiente de regresión R² satisfactorio obtenido, se preparó una muestra, a la cual se le añadió paulatinamente cantidades muy pequeñas de agua destilada con ácido cítrico disuelto por muestras triplicadas.

$$\text{pH} = \text{pHi} - 82,75 \times \text{Ácido Cítrico (g)} \quad (\text{Ec-1})$$

Una vez que se estabilizó el pH seleccionado, se procedió a medir el espectro de absorbancia en el rango de 380 nm hasta 780 nm, utilizando cubetas de 10 mm de cuarzo en un Espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 21 DUV UV/VIS. Los parámetros CIE L*a*b* fueron calculados a partir de los espectros y a partir de ellos se calculó el Chroma y el Hue a*b*.

Por último, para determinar el pH del extracto “Sangría” en el tiempo y con la finalidad de evaluar su estabilidad en los alimentos que utilicen Ácido Cítrico y con esto el uso de compuestos búfer, se tomó una muestra del extracto “Sangría” y se midió por triplicado el

pH de extracción (pHi). Posteriormente se fueron acidificando muestras en grupos de tres para un total de 9 muestras, y se les fue bajando el pH utilizando el mismo procedimiento.

Asimismo, tanto las muestras sin acidificar como a las que se le añadió el Ácido Cítrico se almacenaron en tubos de ensayo con tapa plástica de rosca en el laboratorio de Ingeniería y Tecnología de Alimentos (L.I.T.A.) (De la Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales “Ezequiel Zamora” (UNELLEZ), Vicerrectorado de Infraestructura y Procesos Industriales, San Carlos, Estado Cojedes, Venezuela) a temperatura de 21 °C y con luz proveniente de lámparas fluorescentes de 34 vatios (watts) por 4,5 y 21,5 horas. Al final de cada período, se midió nuevamente el pH de todas las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación Del Ácido Cítrico:

No se encontró en la literatura ningún trabajo con el cual se pudiera comparar los resultados obtenidos (Tabla 2).

Con el fin de comprobar si el ácido cítrico era apropiado para conducir este ensayo, se procedió a añadir cantidades iguales de ácido cítrico a tres muestras del extracto “sangría”. El valor promedio del pH inicial (pHi) de las tres muestras fue de 8,43 y el mismo fue disminuyendo a medida que se le añadía el ácido cítrico, hasta llegar a un valor de pH de 5,94 con 0,0311g de ácido cítrico (todos los valores representados en estos resultados promedian las lecturas hechas a cada una de las tres muestras independientes). En la figura 1 se puede apreciar el descenso observado del pH y que se produjo de acuerdo con la ecuación N° 1.

$pHi = \text{pH del extracto acuoso medido al iniciar la prueba (8,43)}$.

$$\alpha = 0,05 \quad R^2 = 0,9953.$$

Tabla 2. Representación de pH en las muestras de sangría

pH inicial	pH 4,5 horas	pH 21,5 horas
7,65	7,48	6,06
7,00	7,29	5,95
6,00	6,22	5,35
5,50	5,51	5,1
5,00	5,01	4,49
4,50	4,45	4,48
4,00	3,88	3,98
2,75	2,70	2,77

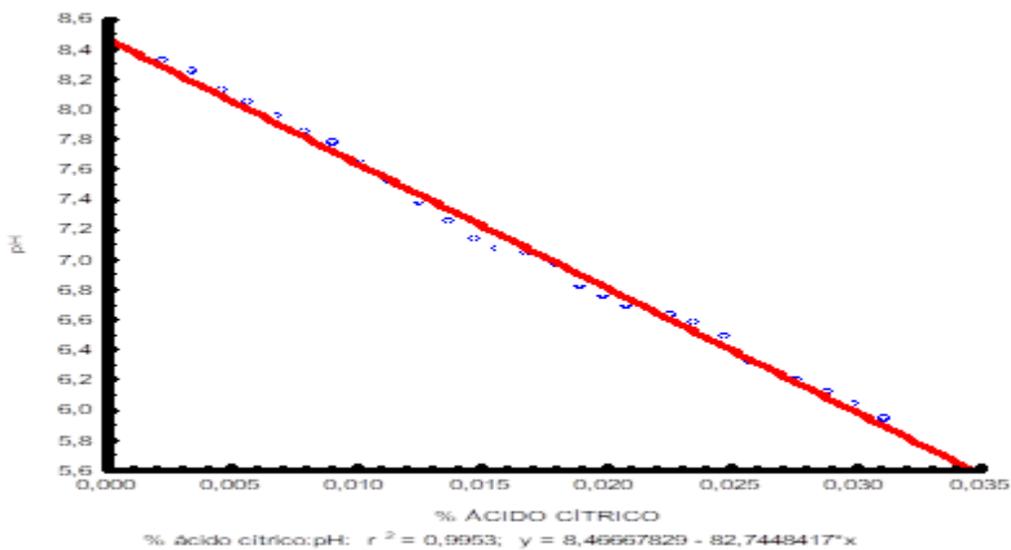


Figura 1. Efecto del ácido cítrico en los cambios de pH de muestras de sangría.

El resultado es que el cambio de pH de las muestras no cambia en forma significativa ($p = 0,705$), por lo que, una vez llevada una muestra a un valor de pH, este se mantiene con pocas variaciones en el lapso de tiempo estudiado.

El ácido cítrico, aún en pequeñas cantidades, provoca una marcada disminución en el pH del extracto “Sangría” (Figura 1). La disminución del pH según la cantidad de Ácido

Cítrico puede ser predicha bastante bien con la siguiente ecuación: $\text{pH} = 8,4667 - 82,74 * \% \text{ ácido cítrico (g/100mL)}$ $R^2 = 0,9976$ $p = 0,000000$.

Efecto del pH sobre el espectro:

Como se ha descrito en Barreto (2008), el extracto acuoso de la planta *J. secunda*, presenta un punto máximo de absorbancia ($\lambda_{\text{máx.}}$) que ha sido variable, estando entre 565nm a 580nm en la mayoría de los casos. La muestra N° 1 (pH= 6,5) mostró un espectro de absorbancia típico, con una absorbancia máxima ($\lambda_{\text{máx.}}$) de 575nm. Presentó un pico secundario de absorbancia (también típico) en los 410nm. A medida que desciende el valor de pH, desde su nivel inicial o de extracción hasta un pH de 2,5; ambos picos de absorbancia ven disminuido su nivel. Desde 4,00 hasta 2,50, las variaciones son pocas en la disminución del $\lambda_{\text{máx}}$ del primer rango. Por otro lado, en un valle que se aprecia en el espectro de pH de extracción, con el punto más bajo a 460nm, comienza a aumentar el valor de absorbancia. La línea del espectro se va suavizando hasta hacerse una línea ondulada sin picos pronunciados como puede observarse en la figura 2.

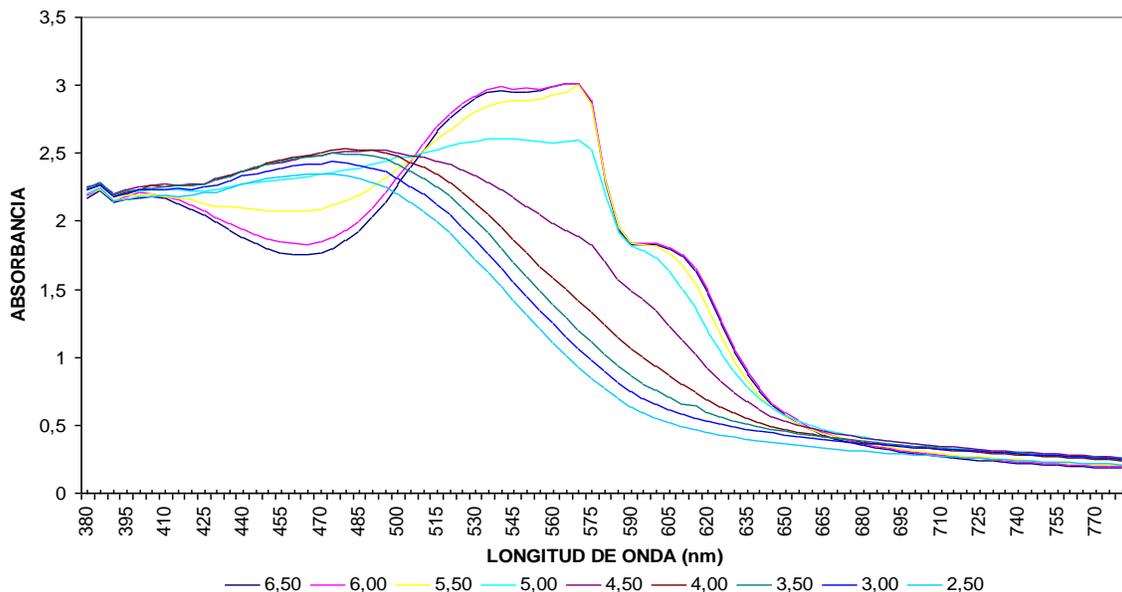


Figura 2. Efecto del pH en los espectros de absorbancia de 3 muestras del extracto acuoso de *j. secunda* (cada valor de absorbancia corresponde al promedio de las 3 muestras)

Efecto del pH sobre el parámetro CIE Δ^* :

Los cambios observados en los espectros, como es de esperarse, provocan un cambio de color del extracto acuoso a medida que este se va acidificando. En el Tabla 3 se puede apreciar los diferentes parámetros CIE $L^*a^*b^*$, Chroma, Hue a^*b^* que exhiben muestras del extracto acuoso de *J. secunda* (Sangría) a medida que se incrementa la acidez de estos. Cada valor corresponde al promedio de tres (3) muestras de Sangría independientes. Los cambios observados en los diferentes parámetros CIE, son expresados en términos de cambios de color o ΔE según la siguiente Ecuación CIE: $\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$

Tabla 3. Valores de pH y Parámetros CIE $L^*a^*b^*$, Chroma, Hue a^*b^* y ΔE

Muestra	pH	L*	A*	b*	Chroma	Hue a^*b^*	ΔE
1	6,50	13,0	37,4	2,4	37,5	3,6	
2	6,00	12,6	37,0	3,8	37,3	5,9	1,53
3	5,50	13,2	38,2	10,9	39,8	15,9	8,56
4	5,00	14,3	38,2	18,0	42,2	25,2	15,70
5	4,50	19,6	39,5	29,8	49,5	37,0	28,27
6	4,00	27,5	41,8	43,3	60,2	45,9	43,62
7	3,50	32,2	42,2	51,1	66,3	50,3	52,57
8	3,00	30,9	41,1	56,1	70,3	52,9	56,73
9	2,50	40,1	43,5	61,5	75,4	54,6	65,31

Se procedió a medir la diferencia existente entre los colores (Muestra N vs Muestra N-1) utilizando el error delta o ΔE para saber cuánta desviación hay entre un valor de pH y otro. Comparando los valores ΔE válidos universalmente según la norma ISO 12647-2 (Biedma, 2019) notamos que solo tolera descensos de pH de 6,5 a 6,0; siendo los cambios muy notorios al ojo al descender de este valor.

En este sentido, la ecuación del modelo ajustado es de la forma:

$$\Delta E = 116,331 - 19,3636 * \text{pH} \quad (\text{Ec-2})$$

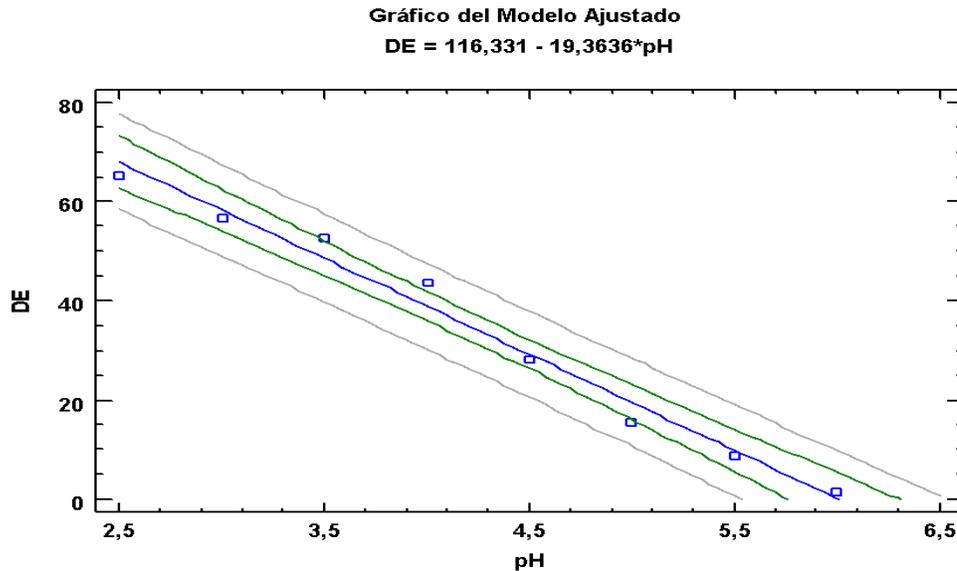


Figura 3. Modelo ajustado $\Delta E = 116,331 - 19,3636 \cdot pH$

Existe una relación estadísticamente significativa entre ΔE y pH con un nivel de confianza del 95,0%. Hay indicación de una posible correlación serial con un nivel de confianza del 95,0% evidenciado en la figura 3 y tabla 4.

El coeficiente de correlación es igual a $-0,991646$, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

Tabla 4. Análisis de la varianza para Regresión Simple para ΔE vs. pH

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	3936,95	1	3936,95	354,62	0,0000
Residuo	66,6123	6	11,102		
Total (Corr.)	4003,57	7			

Por lo que el:

- Coeficiente de Correlación = $-0,991646$.
- $R^2 = 98,3362$ por ciento.

- R^2 (ajustado para g.l.) = 98,0589 por ciento.
- Error estándar del est. = 3,33197.
- Error absoluto medio = 2,53348.
- Estadístico Durbin-Watson = 1,2941 (P=0,0458).
- Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,287427.

Por su parte, en la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos según el diseño seguido en donde los factores de almacenamientos están representados de manera binaria con ceros y unos, mientras que los factores de preparación se indican nominalmente. La tabla 6 o Tabla ANOVA descompone la variabilidad obtenida de ΔE en contribuciones debidas a las distintas preparaciones. La contribución de cada preparación se mide eliminando los efectos de los demás. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores y se puede concluir de la tabla 6 que ninguno de los preparados ó interacciones de estos tiene un efecto estadísticamente significativo sobre ΔE con un 95,0% de nivel de confianza.

Tabla 5. Efecto de diferentes condiciones estudiadas en el parámetro CIE ΔE^*

Aire	Luz	Ingrediente	ΔE
0	0	testigo	8,07
1	0	testigo	10,65
0	1	testigo	14,97
1	1	testigo	9,63
0	0	NaCl	13,35
1	0	NaCl	12,28
0	1	NaCl	16,03
1	1	NaCl	19,41
0	0	Azúcar	12,66
1	0	Azúcar	11,42
0	1	Azúcar	13,67
1	1	Azúcar	12,70
0	0	testigo	16,38
1	0	testigo	11,19
0	1	testigo	8,54
1	1	testigo	11,67
0	0	NaCl	14,46
1	0	NaCl	11,11
0	1	NaCl	13,54
1	1	NaCl	10,70

Tabla 5. (Cont.)

Aire	Luz	Ingrediente	ΔE
0	0	Azúcar	13,31
1	0	Azúcar	11,10
0	1	Azúcar	13,47
1	1	Azúcar	11,61
0	0	testigo	19,98
1	0	testigo	15,49
0	1	testigo	16,85
1	1	testigo	16,44
0	0	NaCl	18,12
1	0	NaCl	18,78
0	1	NaCl	18,48
1	1	NaCl	18,50
0	0	Azúcar	17,08
1	0	Azúcar	17,94
0	1	Azúcar	16,67
1	1	Azúcar	17,24

Tabla 6. Análisis de Varianza para DE - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
COVARIABLES					
Aire	8,77147	1	8,77147	0,82	0,3729
Luz	1,26563	1	1,26563	0,12	0,7336
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Ingrediente	26,4912	2	13,2456	1,23	0,3049
RESIDUOS	332,598	31	10,729		
TOTAL (CORREGIDO)	369,126	35			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

CONCLUSIONES

La estabilidad del color del extracto acuoso de Justicia secunda se ve afectada por el pH, mostrando variaciones hacia la acidez. El ácido cítrico, ingrediente común presente en los alimentos provoca una marcada disminución en el pH del extracto “Sangría” (Figura N° 1) la cual puede ser predicha la ecuación: $pH = 8,4667 - 82,74 * \% \text{ ácido cítrico (g/100mL)}$ $R^2 = 0,9976$ $p = 0,000000$.

Comparando los valores ΔE válidos universalmente según la norma ISO 12647-2 (Biedma, 2019) notamos que no se observan cambios de color con rango de pH de 6,5 a 6,0, siendo los cambios muy notorios al ojo al descender de este valor, ya que se comprobó

una relación estadísticamente significativa entre ΔE y pH con un nivel de confianza del 95,0%.

En relación con los demás ingredientes y factores estudiados, ninguno de estos o sus interacciones tienen un efecto estadísticamente significativo sobre ΔE con un 95,0% de nivel de confianza, por lo que se concluye que el color del extracto acuoso se mantiene estable con la adición de sacarosa o sal y que la luz, así como el oxígeno tampoco afectan al color al almacenarlos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Barreto, R. (2008). Obtención y caracterización de un colorante natural a partir del extracto acuoso de la planta Justicia secunda Vahl. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Experimental De Los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora.
- Biedma González, M. (2020). Discriminación visual del color. (Trabajo Fin de Grado Inédito). Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Carrubba, A and Calabrese I. (1998) Vegetable Extracts as Natural Sources of Dyes. En Ed. S. Scannerini, et al. Proc. Plant Biotechnology as a tool for the Exploitation of Mountain Lands. Acta Hort. 457, ISHS.
- Carrubba, A. Calabresse, I. y Matranga, A. (2000). Coloranti Alimentari di origine vegetale. Tai del Convengo Internazionale e qualità della vita. Sassari. Italia. II Volume.
- De Saint Blanquat (2000). Colorantes Alimentarios en: Multon, J.L (Coordinador). Aditivos y Auxiliares de Fabricación en las industrias agroalimentarias. 2ª Edición. Zaragoza: Acribia p 343.
- Ihl, M., Shene, C, Scheuermann, E. and Bifani, V.. (1994) Correlation for Pigment Content through Colour Determination using Tristimulus Values in a Green Leafy Vegetable, Swiss Chard. J. Sci. Food Agric. 66, 527-531.