



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE MAÍZ CRIOLLO
MORADO ASISTIDA POR ENZIMAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

JAZMIN PINEDA LOPERENA



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Raúl Genaro Aguilar Caballero

VOCAL: Profesor: Arturo Navarro Ocaña

SECRETARIO: Profesor: José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

1er SUPLENTE: Profesora: Bertha Julieta Sandoval Guillén

2do SUPLENTE: Profesora: Gloria Díaz Ruiz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 321 DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA CONJUNTO E
FACULTAD DE QUÍMICA UNAM

ASESOR DEL TEMA: ARTURO NAVARRO OCAÑA

SUSTENTANTE: JAZMÍN PINEDA LOPERENA

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVO GENERAL E HIPÓTESIS	4
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	5
1.1 Biocolorantes	5
1.1.2 Clasificación de biocolorantes	5
1.2 Antocianinas.....	7
1.2.1 Estructura	8
1.2.2 Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas.....	9
1.2.2.1 pH.....	10
1.2.2.2 Temperatura	11
1.2.2.3 Luz.....	11
1.2.2.4 Oxígeno	12
1.2.2.5 Copigmentación	12
1.2.3 Aspectos metodológicos para la obtención de Antocianinas	13
1.2.3.1 Extracción	13
1.2.3.2 Purificación de extractos crudos.	13
1.2.3.3 Cromatografía de capa fina	14
1.2.3.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	14
1.2.4 Las antocianinas en la salud.....	15
1.3 Maíz.	16
1.3.1 La planta de maíz	17
1.3.2 Estructura del grano de maíz.....	18
1.3.3 Aplicaciones del maíz	21

2.4 Enzimas	22
1.4.1 Uso de enzimas en la industria.....	22
1.5 Extracción asistida con enzimas de compuestos bioactivos de plantas.....	24
1.5.1 Extracción de compuestos aromáticos asistida con enzimas.	26
1.5.2 Extracción de pigmentos asistida con enzimas	28
1.5.3 Obtención de Antocianinas mediante extracción asistida por enzimas..	29
CAPÍTULO 2.METODOLOGIA	31
EQUIPOS Y REACTIVOS	31
DIAGRAMA GENERAL.....	32
ETAPA 1. Preparación de las muestras.....	33
2.1 Selección de una muestra.....	33
2.2 Preparación de las muestras	33
2.3 Selección de enzimas	33
ETAPA 2. Extracción de pigmentos	34
2.4 Extracción de pigmentos.....	34
2.5 Preparación de control	37
2.6 Semipurificación del extracto	38
2.7 Cuantificación de antocianinas totales	38
ETAPA 3. Determinación de fenoles totales.....	39
2.8 Cuantificación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu.....	39
ETAPA 4. Determinación de perfil de antocianinas por HPLC	40
2.9 Determinación de perfil de antocianinas por HPLC y cuantificación de cianidina-3-glucósido	40
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
ETAPA 1. Preparación de las muestras.....	41

3.1 Selección y preparación de las muestras.....	41
ETAPA 2. Extracción de pigmentos	42
3.2 Determinación de antocianinas totales	43
3.2.1 Extracción de pigmentos con metanol ácido.....	43
3.2.2 Extracción asistida con enzimas.....	43
3.2.2.1 Determinación del tipo de buffer y pH adecuados para la extracción asistida con enzimas del pericarpio de maíz.	44
3.2.2.2 Determinación de la temperatura adecuada para la extracción asistida con enzimas del pericarpio de maíz.	49
3.2.2.2 Determinación del porcentaje de enzima adecuado para la extracción asistida con enzimas del pericarpio de maíz.	52
3.2.2.4 Determinación del tipo de buffer y pH adecuados para la extracción asistida con enzimas del olote de maíz.	57
3.2.3 Extracción con metanol ácido y posteriormente extracción asistida con enzimas	62
ETAPA 3. Determinación de fenoles totales.....	66
3.3 Cuantificación de fenoles totales.....	66
ETAPA 4. Determinación de perfil de antocianinas por HPLC	73
3.4 Determinación de perfil de antocianinas por HPLC.....	74
CONCLUSIONES	81
PERSPECTIVAS	83
ANEXO A	84
ANEXO B	85
BIBLIOGRAFÍA	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de colorantes naturales según su naturaleza química	6
Tabla 2. Ocurrencia de antocianinas en fuentes naturales.	8
Tabla 3 . Tipos de maíz	21
Tabla 4. Algunas aplicaciones industriales de enzimas y sus principales usos. ...	24
Tabla 5. Compuestos bioactivos aislados mediante extracción asistida con enzimas.	27
Tabla 6. Colorantes naturales obtenidos mediante extracción asistida por enzimas.	29
Tabla 7. Enzimas de trabajo seleccionadas.	34
Tabla 8. Concentración de antocianinas totales obtenida de la extracción con metanol ácido.	43
Tabla 9. Concentración de antocianinas totales obtenida del pericarpio de maíz a partir de la extracción con diferentes buffer y pH	46
Tabla 10. Concentración de antocianinas totales obtenida de la extracción de pericarpio de maíz a diferentes temperaturas.	50
Tabla 11. Concentración de antocianinas totales obtenida de la extracción del olote de maíz con diferentes buffer y pH. **	59
Tabla 12. Concentración de antocianinas totales obtenida de la extracción de olote de maíz.	60
Tabla 13. Concentración de antocianinas totales obtenida de la doble extracción* del pericarpio de maíz.	63
Tabla 14. Concentración de antocianinas totales obtenida a partir de la doble extracción* del olote.	64
Tabla 15. Concentración de fenoles totales obtenida de la extracción del pericarpio de maíz con diferentes buffer y pH.	68
Tabla 16. Concentración de fenoles totales obtenida de la extracción del pericarpio de maíz con diferentes temperaturas y concentración de enzima.	69
Tabla 17. Concentración de fenoles totales obtenida a partir de la doble extracción del pericarpio.	70

Tabla 18. Concentración de fenoles totales obtenida a partir de la extracción del olote de maíz con diferentes pH.....	72
Tabla 19. Concentración de fenoles totales obtenida a partir de la doble extracción del olote.....	72
Tabla 20. Concentración de cianidina-3-glucósido obtenida del pericarpio de maíz a diferentes pH.....	75
Tabla 21. Concentración de cianidina-3-glucósido obtenida a partir de la extracción del pericarpio de maíz a diferentes temperaturas y concentración de enzima.....	76
Tabla 22. Concentración de cianidina-3-glucósido obtenida de la doble extracción del pericarpio.....	76
Tabla 23. Concentración de cianidina-3-glucósido obtenida a partir de la extracción del olote de maíz a diferentes pH.....	78
Tabla 24. Concentración de cianidina-3-glucósido obtenida a partir de la doble extracción del olote.	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de ión flavilio	9
Figura 2. Estructura de las antocianinas y sustituyentes	9
Figura 3. Cuatro principales formas de equilibrio de antocianinas existentes en medios acuosos.	11
Figura 4. Crecimiento de la planta de maíz	17
Figura 5. Estructura del grano de maíz corte transversal y corte longitudinal.	18
Figura 6. Composición del grano de maíz y sus partes anatómicas.....	20
Figura 7. Concentración de antocianinas totales del pericarpio a diferentes pH con buffer de Fosfatos.	47
Figura 8. Concentración de antocianinas totales del pericarpio a diferentes pH con buffer de Acetatos (0.1M).....	47
Figura 9. Concentración de antocianinas totales del pericarpio a diferentes pH con buffer de Citratos (0.1M)	48
Figura 10. Concentración de antocianinas totales del pericarpio a diferentes temperaturas con buffer de Acetatos (0.1M) pH 3.....	51
Figura 11. Concentración de antocianinas totales del pericarpio a diferentes temperaturas con buffer de Citratos (0.1M) pH 3	52
Figura 12. Concentración de antocianinas totales del pericarpio con diferentes porcentajes de enzima con buffer de Acetatos (0.1M) pH 3.....	55
Figura 13. Concentración de antocianinas totales del pericarpio con diferentes porcentajes de enzima con buffer de Citratos (0.1M) pH 3	55
Figura 14. Concentración de antocianinas totales del olote a diferentes pH con buffer de Acetatos	59
Figura 15. Concentración de antocianinas totales del olote a diferentes pH con buffer de Citratos.....	60
Figura 16. Concentración de antocianinas totales del olote a diferentes pH con buffer de Acetatos y buffer de Citratos.	62
Figura 17. Concentración de antocianinas totales del pericarpio con buffer de Acetatos y buffer de Citratos. (Doble extracción)	64

Figura 18. Concentración de antocianinas totales del olote con buffer de Acetatos y buffer de Citratos. (Doble extracción).	65
Figura 19. Concentración de fenoles totales del pericarpio de maíz con buffer de Acetatos a diferentes pH.	67
Figura 20. Concentración de fenoles totales del pericarpio de maíz con buffer de Citratos a diferentes pH.....	67
Figura 21. Análisis de regresión entre antocianinas y fenoles totales del pericarpio de maíz.	71
Figura 22. Análisis de regresión entre antocianinas y fenoles totales del olote de maíz.	73
Figura 23. Curva patrón de fenoles totales.....	84
Figura 24. Curva patrón para cianidina-3-glucósido	85

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por ser la Máxima Casa de Estudios y permitirme formar parte de ella. Por ser mi segunda casa y mi refugio en tantas ocasiones. Porque en tus instalaciones he pasado momentos inolvidables como estudiante y ser humano.

Al Dr. Arturo Navarro por darme la oportunidad de llevar a cabo esta investigación, por sus palabras, el conocimiento y las experiencias que compartió conmigo.

A la Dra. Hilda Calderón por su apoyo y atentos comentarios durante mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Raúl Genaro Aguilar y al Dr. Guillermo de Jesús Aguilar por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y sus valiosos comentarios para su mejora.

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo del proyecto PAPIIT IN223611.

DEDICATORIAS

A mis padres por su enorme cariño, comprensión, confianza, apoyo y amistad. A ti papá por enseñarme a enfrentar la vida con una gran fortaleza, por ser “tu mamá chiquita”, por enseñarme que no pasa nada, ¿y si pasa?, no pasa nada, porque siempre estarás a mi lado y serás mi más grande ejemplo.

A ti mamá por tener siempre una respuesta ante cualquier situación, por enfrentar la vida con esa valentía y gran compromiso, por ser el pilar de esta familia y brindarme siempre un abrazo cuando más lo necesito, por tu inmenso amor.

A ti Gus por tu apoyo y ser más que mi hermano, por todos los momentos compartidos, por llenar mi vida de buen humor y buena vibra, por ser mi guía en muchos aspectos y tener siempre un buen consejo, porque sé que siempre puedo contar contigo.

A toda mi familia que directa o indirectamente siempre me han apoyado y han formado una parte importante de este camino.

A Oscar por tu incondicional complicidad, compañía y amistad. Por estar a mi lado en los momentos agradables así como en los más difíciles, por el cariño brindado y los sueños compartidos, gracias por estar todo este tiempo junto a mí.

A quienes han hecho de mi vida una gran aventura, por ser pilar, escucha y motivo de sonrisas, mis amigos, gracias por su apoyo en todo momento y seguir cerca de mi. A Carla, Mele, Fer, Juan Carlos, Humberto, Lalo, todos los macuarros (como yo les llamo), Pedro, César, Isabel, por mencionar algunos y sin afán de excluir a nadie, todos son parte de este trabajo.

A todos ustedes con los que ha sido un placer compartir el gusto por la Química, que han amenizado cada momento de mi estancia en la facultad, por recorrer este camino conmigo, a todos y cada uno de la *Banda 15 y miembros honorarios*, que no hace falta mencionarlos ya saben quienes son!. Los quiero y agradezco su amistad.

A los QAs que compartieron conmigo esas horas de clase haciéndolas más amenas y más llevaderas, haciéndome pasar de las mejores experiencias en la facultad. Con una mención especial a ti Mitzi, Alan y Karina, gracias por todo!.

A las chicas 321 por hacer esas tardes en el laboratorio tan amenas, por lograr que esas horas de trabajo se pasaran rapidísimo. Gracias Natys por tu apoyo y compañía en este trabajo, Ruthy por tus ocurrencias y clases de baile y Anabel por tus terapias y buenos consejos.

A todos aquellos que en este momento se escapen de mi memoria, una disculpa y gracias por todo.

Por ultimo me gustaría comentar que es un gusto llegar a esta página que, si bien es la primera en leerse, es la última que escribo y que en la esencia de este trabajo me acompañan todos ustedes.

Gracias a todos aunque el tiempo y la distancia no nos permitan estar juntos, siempre los tengo presentes y son parte importante de lo que soy.

Gracias!! Los quiero!!!

“Por mi raza hablara el espíritu”

Jazmín Pineda Loperena

Marzo 2012

RESUMEN

Este trabajo tiene como finalidad la obtención de extractos enriquecidos de antocianinas de maíz criollo morado por medio de una extracción asistida por enzimas.

La parte experimental se realizó en cuatro etapas, en cada una de las cuales se utilizaron dos tipos de muestras: el pericarpio del grano del maíz y el olote. La primera etapa consistió en la preparación de las muestras y la selección de las enzimas de trabajo.

Durante la segunda etapa se determinaron las condiciones de extracción, como lo es la temperatura, pH, buffer y enzimas. En el caso del pericarpio de maíz se utilizaron enzimas como: feruloilsterasas, alfa amilasa y cocteles comerciales de enzimas que contienen hemicelulasas; para el olote se utilizaron cocteles de celulasas y hemicelulasas.

La determinación de las mejores condiciones se realizó en base a la concentración de antocianinas totales utilizando el método pH diferencial. Lo que se obtuvo para el caso del pericarpio fue que los buffer de acetatos y citratos a un pH de 3 daban los mejores valores no existiendo diferencia significativa entre ellos; la temperatura de extracción de 25°C y una concentración de enzima de 2%(p/p).

Para la muestra de pericarpio el Depol 740L obtuvo el mejor resultado para antocianinas totales, de 7.5746 mg/g de muestra, realizando el análisis de varianza nos indica que no existe diferencia significativa entre las enzimas utilizadas.

Las mejores condiciones para el caso del olote fueron el buffer de acetatos y citratos iniciando con un pH de 4.5 y ajustándolo después de 3 horas a un pH de 3, con un 2%(p/p) de enzima y 25°C. El mejor coctel de enzimas fue el NS-50012 obteniendo una concentración de antocianinas totales de 7.2898 mg/g de muestra. Para esta muestra no se encontró diferencia significativa entre las enzimas

utilizadas. En estos casos se obtuvo un rendimiento del 50% más comparándolo con el método convencional de metanol acidificado.

Dentro de esta etapa también se realizó la extracción en dos etapas, 1) la convencional con metanol acidificado y 2) extracción asistida por enzimas, con esto se observaron concentraciones similares a las obtenidas con la extracción asistida con enzimas, con ello se observó que la extracción asistida por enzimas resulta eficiente y con buenos rendimientos en comparación con los métodos convencionales basados en extracción con disolventes.

En la tercera etapa se realizó la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, con esto se observó que la concentración mayor de fenoles totales expresada como ácido gálico (mg/g de muestra) se obtuvieron con las mismas condiciones encontradas para las antocianinas.

En la cuarta etapa se determinó el perfil de antocianinas por cromatografía de líquidos de alta resolución, y se cuantificó la cianidina-3-glucósido. Se observó que en las muestras donde existe una concentración mayor de cianidina-3-glucósido fueron las tratadas con buffer de acetatos y citratos a un pH de 3, como en el caso de la cuantificación de antocianinas totales. En este caso se obtuvo 3.9746 mg/g de muestra, para el tratamiento con el pool enzimas Depol 670L con el buffer de acetatos. Existe un incremento en la concentración de la cianidina del 60% en comparación con la obtenida con la muestra control.

En las muestras donde no se determinó la presencia de la cianidina-3-glucósido se observó una tendencia similar entre ellas, donde el incremento se observa en la peonidina-3-glucósido que se identificó de acuerdo a su tiempo de retención reportado en la literatura al no contar con un estándar.

Con los resultados obtenidos se puede decir que la extracción asistida por enzimas ayuda a la liberación de las antocianinas que se encuentran en los tejidos de los granos y pericarpio de maíz brindando una alternativa para la obtención de colorantes naturales a partir de este cereal.

INTRODUCCIÓN

El maíz pertenece a la familia de las gramíneas y su nombre científico es *Zea mays*, gracias a la transmisión de conocimientos sobre su cultivo se han logrado conservar especies criollas de diferentes colores entre los cuales se encuentran amarillos, rojos, morados y azules, siendo en gran medida las antocianinas los compuestos que brindan esas tonalidades, estas pueden encontrarse en el pericarpio y en la capa de aleurona del grano, aunque es posible observar el color muchas veces en el olote, hojas y tallo de dicha planta.

Las antocianinas son un grupo importante de compuestos solubles en agua que aportan el color rojo, púrpura y azul que se observa en flores, frutos y otras partes de las plantas. Debido a sus colores brillantes y propiedades antioxidantes, las antocianinas son una alternativa importante para la sustitución de los colorantes sintéticos utilizados en la industria de alimentos.

Las antocianinas son catalogadas como agentes nutracéuticos, varios trabajos reportan sus efectos benéficos al prevenir la proliferación de células cancerígenas, protección contra enfermedades del corazón y prevención del daño a lípidos de alimentos.

El uso de enzimas para mejorar el contenido de antocianinas se ha probado en la producción de vino tinto y jugo de frutas procesado ya que son compuestos deseables en estos productos. Además de ello la extracción asistida con enzimas para la obtención de compuestos bioactivos ha demostrado que es posible mejorar los rendimientos alcanzados por los métodos a base de solventes además que abren la puerta para el desarrollo de una “química verde”.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo principal la obtención de extractos enriquecidos en antocianinas a partir de maíz criollo morado por medios de una extracción auxiliada con enzimas.

OBJETIVO GENERAL

Obtener extractos enriquecidos de antocianinas a partir del pericarpio y olote de maíz criollo morado por medio de una extracción asistida con enzimas, utilizando cocteles con feruloilesterasas para el caso del pericarpio y cocteles de celulasas y hemicelulasas para el caso del olote.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las condiciones adecuadas (solución buffer, pH, temperatura y concentración de enzimas) para la extracción asistida con enzimas.
- Obtener los extractos de antocianinas utilizando enzimas como feruloilesterasas para el pericarpio de maíz y cocteles de celulasas y hemicelulasas para el olote.
- Determinar la cantidad de fenoles y antocianinas totales para cada uno de los extractos obtenidos.
- Determinar el perfil de antocianinas y cuantificación de cianidina-3-glucósido por el método de HPLC para cada uno de los extractos obtenidos.

HIPÓTESIS

Las antocianinas son moléculas que se encuentran en las células de la planta de maíz, la pared de dichas células están compuestas principalmente por celulosa y hemicelulosa por lo que al utilizar enzimas que degradan esta pared se ayuda a liberar las moléculas que se encuentran en su interior, lo cual se ve reflejado en un incremento en el rendimiento de la extracción de estos compuestos.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Biocolorantes

Los biocolorantes son como su nombre lo indica colorantes obtenidos de fuentes biológicas y se han clasificado de dos formas: naturales y artificiales.

El término biocolorante natural indica que la fuente del color es natural o de naturaleza idéntica por el creciente uso de biotecnología, mientras que el término biocolorante artificial indica que aunque el colorante se sintetiza biológicamente, se puede producir por reacciones químicas sin la necesidad de la fuente natural como la cúrcuma y β -caroteno.

Plantas, animales y microorganismos son fuentes de biocolorantes naturales, pero pocos de ellos están disponibles en cantidades suficientes para uso comercial como colorante de alimentos y en su mayoría son de origen vegetal. Algunos de estos colorantes son: pigmento de remolacha y azafrán.

Hoy en día, existe la producción fermentativa de pigmentos de calidad alimentaria disponibles en el mercado, por ejemplo, el color de *Monascus sp.*, la astaxantina de *Dendrorhous xanthophyllomyces*, color rojo de *Oxalicum penicillium*. (Chattopadhyay, et.al. 2008)

Para considerar los biocolorantes naturales como un colorante hay que tener en cuenta la estabilidad, el rendimiento y el precio, en su elaboración que en su mayoría pueden ser restricciones. A pesar de estos factores, los biocolorantes naturales van ganando importancia debido a su aporte a la salud, la nutrición y la conciencia por el medio ambiente.

1.1.2 Clasificación de biocolorantes

La clasificación de colorantes naturales se ha llevado a cabo de acuerdo a su estructura química (Tabla 1) aunque la variabilidad tremenda de organismos sobre

Tabla 1. Clasificación de colorantes naturales según su naturaleza química

Naturaleza química	Algunos ejemplos	Color predominante	$\lambda^*_{\text{máx.}}$, nm
Tetrapirroles Lineales y cíclicos	<ul style="list-style-type: none"> Ficobilinas 	Azul-verde	610-650 (ficocianinas)
		Amarillo-rojo	540-570 (ficoeritrinas)
	<ul style="list-style-type: none"> Clorofila 	Verde	640-660
Carotenoides (tetraterpenoides)	Carotenoides	Amarillo-anaranjado	400-500
Flavonoides	<ul style="list-style-type: none"> Flavonas 	Blanco-crema	310-350
	<ul style="list-style-type: none"> Flavonoles 	Amarillo-blanco	330-360
	<ul style="list-style-type: none"> Chalconas 	Amarillo	340-390
	<ul style="list-style-type: none"> Auronas 	Amarillo	380-430
	<ul style="list-style-type: none"> Antocianinas 	Rojo-azul	480-550
Xantonas	Xantonas	Amarillo	340-400
Quinonas	<ul style="list-style-type: none"> Naftoquinonas 	Rojo-azul-verde	420-460
	<ul style="list-style-type: none"> Anraquinonas 	Rojo-púrpura	
Derivados indigoides e índoles	<ul style="list-style-type: none"> Índigo 	Azul-rosado	
	<ul style="list-style-type: none"> Betalaínas 	Amarillo-rojo	420-485 Betaxantinas 530-554 Batacianinas
Pirimidinas sustituidas	<ul style="list-style-type: none"> Pterinas 	Blanco-amarillo	
	<ul style="list-style-type: none"> Flavinas 	Amarillo	
	<ul style="list-style-type: none"> Fenoxazinas 	Amarillo-rojo	
	<ul style="list-style-type: none"> Fenazinas 	Amarillo-púrpura	

* Son valores aproximados, los valores varían de acuerdo al modelo de sustitución y a los solventes utilizados; sólo se señala el rango de absorción a mayor longitud de onda.

el mundo impide que un grupo numeroso de pigmentos misceláneos no se acomoden dentro de esta clasificación. Es común, encontrar informes en el descubrimiento de pigmentos nuevos en bacterias, hongos, e invertebrados, cuyas características estructurales no corresponden totalmente a un grupo o a otro. (Delgado Vargas et.al. 2003)

1.2 Antocianinas

Las antocianina (del griego *Anthos*, una flor y *kyanos*, azul oscuro) son flavonoides que se encuentran comúnmente en la naturaleza.

Las antocianinas son el grupo más numeroso de pigmentos hidrosolubles extendidos en el reino vegetal, son responsables de los colores exhibidos por muchas flores, frutas y vegetales.

Las antocianinas son comunes en las plantas superiores, pero están ausentes en algunas plantas inferiores como las algas. En la naturaleza, es posible encontrar plantas no sólo con un tipo principal de antocianina, esta gama de variabilidad también es común en plantas utilizadas como fuente de alimento. En general, la concentración de antocianinas en la mayoría de frutas y hortalizas oscila desde 0.1 hasta 1% de peso seco. La más extendida de las antocianinas es la cianidina.

Algunas de las fuentes naturales que presentan ocurrencia de antocianinas se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Ocurrencia de antocianinas en fuentes naturales.

Fuente	Nombre científico	Antocianinas presentes*
Cebolla	<i>Alium cepa</i>	Cianidina 3-glucosido, Cianidina 3-galactosa, Peonidina 3-glucosido
Higo	<i>Ficus spp</i>	Cianidina 3-glucosido Pelargonidina 3-glucosido
Fresa	<i>Fragaria spp</i>	Pelargonidina y Cianidina 3-glucosidos
Ciruela	<i>Prunus domestica</i>	Cianidina y Peonidina 3- glucosidos
Camellia	<i>Camellia japónica cvs</i>	Cianidina 3-glucosido
Gladiola	<i>Gladiolus cultivars</i>	Pelargonidina, Cianidina, Malvidina 3- ramnosilglucosido-5- glucosido
Maíz Azul	<i>Zea Mays</i>	Cianidina, Pelargonidina y Peonidina 3-glucosidos

* Se mencionan las más relevantes en las fuentes, pero no se limitan a ser las únicas presentes.

1.2.1 Estructura

Su estructura comprende dos anillos bencénicos unidos por un heterociclo oxigenado, insaturado y catiónico, el catión flavilio que deriva del núcleo 2-fenilbenzopirilio, que es complementada con uno o más moléculas unidas a diferentes posiciones hidroxiladas de la estructura básica. Así, que las antocianinas son glucósidos substituidos de sales de fenil-2-benzopirilio. (Figura 1)

La mayoría de las antocianinas en alimentos, contienen una o dos unidades de monosacárido, comúnmente en la posición 3, algunas veces en posición 3,5 y más raramente en posición 3,7. Las mitades de azúcar están unidas a las antocianidinas a través de las uniones hemiacetálicas.

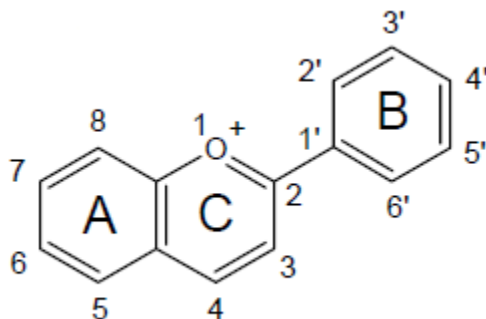
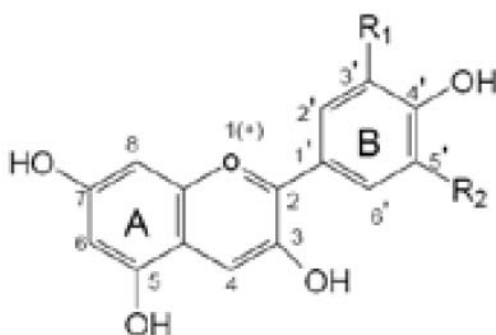


Figura 1. Estructura de ión flavilio (Rein 2005)

El color particular de cada antocianina depende del número y orientación de los grupos hidroxilos y metoxilos. Un incremento en la hidroxilación produce un color azul, mientras un incremento en la metoxilación produce un color rojo.



Aglicona	R ₁	R ₂
Petunidina	OH	OCH ₃
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃
Pelargonidina	H	H
Delfinidina	OH	OH
Cianidina	OH	H
Peonidina	OCH ₃	H

Figura 2. Estructura de las antocianinas y sustituyentes (Cuevas Montilla 2008)

1.2.2 Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas.

La estabilidad de las antocianinas depende de factores como pH, temperatura, oxígeno, luz, metales, etc. Investigaciones recientes demostraron que existen antocianinas con ciertas características, presentando una mayor estabilidad debido al desarrollo de ciertos mecanismos como: la copigmentación (asociación

intermolecular), la acilación (asociación intramolecular) e interacciones con otros compuestos.

1.2.2.1 pH

Las antocianinas son más estables en un medio ácido con valores bajos de pH que en soluciones alcalinas con valores altos de pH. Sin embargo, las antocianinas son conocidas por mostrar gran variedad de variaciones de color de acuerdo al pH en el que se encuentran.

La naturaleza iónica de antocianinas permite los cambios de la estructura en la molécula de acuerdo con el pH predominante, lo que resulta en diversos colores y matices en los diferentes valores de pH.

A pH 1 el catión flavilio es la especie predominante y contribuyen a los colores rojos y púrpuras. En un pH entre 2 y 4 la especie predominante es la base quinoidal que brinda tonos azules. En valores de pH entre 5 y 6 la presencia de base carbinol y chalcona son las predominantes, las cuales son especies incoloras. A pH mayores a 7 la degradación de las antocianinas comienza esto depende de sus grupos que la sustituyen. (Figura 3)

La importancia del pH en el color de las antocianinas, se observa en la intensidad de color, en valores de pH bajo en comparación con el valor de pH superior. Por lo que si el pH no favorece a la forma de ión flavilio, se pierde el color.

El color en una solución alcalina puede ser revertido al cambiar el pH a un valor ácido. Sin embargo, cuando se llega a la forma chalcona y si el valor de pH es muy alto y las chalconas ya se ha formado, esta reversión de color no se podrá realizar más. (Rein 2005)

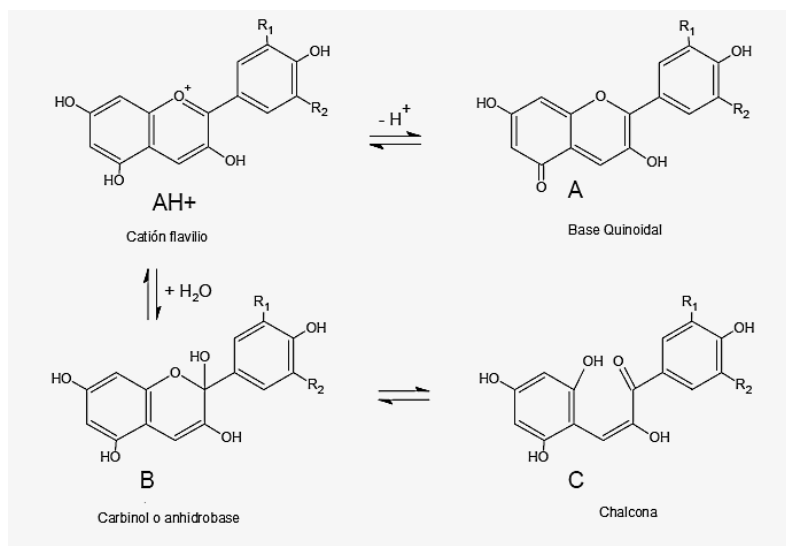


Figura 3. Cuatro principales formas de equilibrio de antocianinas existentes en medios acuosos. (Cuevas 2008)

1.2.2.2 Temperatura

La estabilidad de las antocianinas también se ve afectada por temperaturas mayores a 40 °C. Se ha postulado que la formación de una chalcona es el primer paso en la degradación térmica, esta conduce a productos de color marrón, especialmente en presencia de oxígeno en donde la degradación sigue una cinética de primer orden, combinando alta temperatura y un pH elevado la degradación de los antocianos resulta en tres diferentes derivados del ácido benzoico han sido identificados como productos de la degradación térmica de antocianinas. (Rein 2005)

1.2.2.3 Luz

La luz afecta a las antocianinas de dos formas: la luz es esencial para la biosíntesis de antocianinas, y también acelera su degradación. Las antocianinas son más estables en la oscuridad. Se han realizado estudios donde se observa que la pérdida de antocianinas más vigorosa (70%) se observó bajo luz fluorescente con la temperatura de almacenamiento ligeramente elevada, se

encontró que productos finales de la degradación eran los mismos que se obtienen con la degradación térmica. (Rein 2005)

1.2.2.4 Oxígeno

El oxígeno amplifica el impacto de otros procesos de degradación de antocianinas. La presencia de oxígeno, junto con la temperatura elevada, son las combinaciones más perjudiciales para la estabilidad de estas moléculas.

El efecto nocivo del oxígeno en las antocianinas puede tener lugar a través de un mecanismo oxidativo directo y/o a través de la oxidación indirecta, donde los componentes oxidados de los medios de reacción con más antocianinas dan lugar a productos sin color o color marrón.

Las antocianinas reaccionan también con los radicales de oxígeno, es decir, peroxi-radicales. En tales reacciones, las antocianinas actúan como antioxidantes, y por esta característica de las antocianinas se consideran un contribuyente a la salud contra enfermedades cardiovasculares.

1.2.2.5 Copigmentación

El color de las antocianinas es estabilizado por reacciones con otros componentes naturales y se presenta en las células de flores, frutas y bayas.

Los mecanismos más importantes de copigmentación son las interacciones intermoleculares e intramoleculares. Una amplia gama de moléculas se han encontrado que actúan como copigmentos pueden ser los flavonoides, polifenoles y otros alcaloides, los aminoácidos y ácidos orgánicos.

Los fenómenos de copigmentación se observan como un cambio batocrómico, es decir, el cambio en el longitud de onda de máxima absorción, ya que el color da un cambio en las antocianinas de rojo a azul a través de la copigmentación o se puede ver como un efecto hipercrómico, en la que la intensidad de un color es reforzada. (Escribano-Bailon et. al.2004)

1.2.3 Aspectos metodológicos para la obtención de Antocianinas

1.2.3.1 Extracción

Las antocianinas son moléculas polares y por lo tanto son más solubles en solventes polares (como el agua y etanol) que en solventes no polares. Sin embargo, es evidente que la solubilidad depende de varios factores, incluyendo las condiciones del medio, por ejemplo con un valor de pH en el que la molécula no este ionizada, las antocianinas pueden ser solubles en éter y no son estables en soluciones neutras o alcalinas, por lo que métodos convencionales de extracción implican el uso de ácidos en los disolventes.

Al ser moléculas polares, los solventes más usados para su extracción son mezclas acidificadas de etanol, metanol o acetona o mezclas acuosas de los mismos. El metanol es el más eficiente de los que se ha estudiado sin embargo por su toxicidad en la industria es preferido el etanol.

El ácido clorhídrico, sirve para mantener un pH bajo que a la vez favorece la estabilidad de las antocianinas, sin embargo, se trata de un ácido fuerte, que puede alterar la forma nativa de las antocianinas, por ejemplo, rompiendo algunas asociaciones débiles con copigmentos. En consecuencia el uso de un ácido orgánico débil es recomendado para la extracción.

1.2.3.2 Purificación de extractos crudos.

Se han utilizado diferentes resinas para purificar antocianinas antes del aislamiento o la caracterización tales como: las resinas de intercambio iónico, de poliamida y materiales de gel.

La cromatografía en amberlita, resinas de intercambio iónico y resina en polvo de poliamida, ha sido utilizada para aislar los compuestos polares no fenólicos en los extractos crudos de antocianinas. La cromatografía en columna de gel se puede

utilizar para un mayor aislamiento de las antocianinas ya que es útil para la purificación y la separación de fenoles no poliméricos y polímeros.

La separación cromatográfica de antocianinas desempeña un papel importante en los análisis de los patrones de compuestos fenólicos en los extractos crudos. (Delgado Vargas et. al. 2003)

1.2.3.3 Cromatografía de capa fina

Este tipo de cromatografía se ha utilizado para observar cualitativamente a las antocianinas, esta se ha desarrollado sobre celulosa microcristalizada, gel de sílice o poliamida, se han aplicado una gran variedad de disolventes y los comportamientos de las antocianinas son similares en todos los medios.

Algunos de los sistemas de solventes usados con frecuencia incluyen n-butanol, ácido acético y agua (BAW, 4:1:5), n-pentanol, ácido acético y agua (VAR2:1:1) y el 1% HCl acuoso (agua y HCl concentrado 97:3)

1.2.3.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución.

El equipo de cromatografía líquida de alta resolución ha demostrado ser rápido y sensible para el análisis de los componentes fenólicos vegetales y es especialmente útil para el análisis de antocianos.

La polaridad en general y estereoquímica de las antocianinas son el factor principal para su separación. En general, más glicosilaciones o aumento de hidroxilaciones de la antocianina incrementan la movilidad, mientras que las O-metilaciones y acilaciones aumentan el tiempo de elución. Sin embargo esta es una regla estricta, las desviaciones de este comportamiento pueden depender de la naturaleza y la posición de las sustituciones.

Las típicas fases móviles están compuestas de los gradientes de ácido acético, fosfórico o fórmico en agua-metanol o disolventes como acetonitrilo-agua en los que las antocianinas se encuentran y pueden ser fácilmente detectadas en sus longitudes de onda máximas de absorción.

Las antocianinas son por lo general detectadas con un control de estándares conocidos efectuado de 480 a 550 nm, comparando los tiempos de retención y el espectro UV-Vis.

1.2.4 Las antocianinas en la salud.

Estudios recientes evidencian que el consumo de frutos y vegetales reducen enfermedades coronarias además de minimizar los riesgos de cáncer, se ha descrito que algunos compuestos fenólicos de origen vegetal presentan actividad antioxidante dentro de la célula, reduciendo la concentración de radicales libres.

Las antocianinas protegen de muchas maneras. Primero, neutralizan las enzimas que destruyen el tejido conectivo. Segundo, su capacidad antioxidativa previene los oxidantes del tejido conectivo dañado. Finalmente, reparan proteínas dañadas en las paredes de los vasos sanguíneos. (López et. al. 2009)

Experimentos en animales han demostrado que la suplementación con antocianinas previenen efectivamente la inflamación y el subsecuente daño a vasos sanguíneos. Esta habilidad antiinflamatoria de las antocianinas también ayuda contra las reacciones alérgicas.

Por otro lado se ha observado que su potencial antioxidante va en contra de radicales superóxidos y peróxidos de hidrógeno a través de numerosos mecanismos, por ejemplo: la cianidina: Protege la membrana celular de lípidos de la oxidación por una variedad de sustancias peligrosas. La cianidina es un antioxidante 4 veces más fuerte que la vitamina E. (Delgado Vargas et. al.2003)

La capacidad antioxidante se relaciona con el número de grupos –OH que presenten y el lugar de la sustitución. Cuando se ingieren, las antocianinas son destruidas en parte por la flora intestinal y las que son absorbidas se eliminan por la orina y la bilis, con previas transformaciones

Gracias a esta capacidad antioxidante, las antocianinas son catalogadas como agentes nutracéuticos. Varios trabajos reportan sus efectos benéficos al prevenir

la proliferación de células cancerígenas, protección contra enfermedades del corazón y prevención del daño a lípidos de alimentos.

Las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano. (Delgado Vargas et. al.2003)

1.3 Maíz.

El maíz (*Zea mays*) que es, junto con el arroz y el trigo, uno de los cereales más importante del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales y es una materia prima básica en la industria de la transformación, con la que se producen aceites, almidón, proteínas y desde hace algunas décadas combustible. (Organización de las Naciones Unidas 1993)

El cultivo del maíz tuvo su origen, con toda probabilidad, en América Central, especialmente en México, de donde se difundió. La evidencia más antigua de la existencia del maíz en los granos de polen fosilizados que se encontraron en muestras tomadas de los sedimentos que se depositaron en el lago debajo de la Ciudad de México hace aproximadamente 8000 años. (Dendy et. al. 2001)

En México, con su población de más de 100 millones de habitantes, el maíz es el cereal de mayor producción, al que se destinan más hectáreas de cultivo y el de mayor consumo *per capita*. (Serna-Saldívar 1996)

Botánicamente el maíz pertenece a las familias de las gramíneas y es una planta anual alta dotada de un amplio sistema radicular fibroso. Se trata de una especie que se reproduce por polinización cruzada y la flor femenina (elote, mazorca, espiga) y la masculina (espiguilla) se hallan en distintos lugares de la planta.

El maíz es a menudo de color blanco o amarillo, aunque también hay variedades de color negro, rojo y morado. El consumo de maíz de color se ha incrementado recientemente debido a que se le atribuyen algunas propiedades funcionales y resultan atractivos para los consumidores.

1.3.1 La planta de maíz

El desarrollo de la planta se puede dividir en dos fases fisiológicas. En la primera parte, o fase vegetativa, se desarrollan y diferencian distintos tejidos hasta que aparecen las estructuras florales. La segunda fase, también llamada de reproducción; se inicia con la fertilización de las estructuras femeninas que se diferencian de las espigas y granos. La planta ha desarrollado características y diferencias morfológicas en la fase de reproducción como consecuencia de la evolución, de la selección natural y de la domesticación.

La morfología de la planta también ha sido objeto de cambios que han dado lugar a una gran variedad en el número, longitud y anchura de las hojas, así como la altura de las plantas, los lugares en que aparecen las mazorcas, los ciclos de maduración, los tipos de granos entre otras muchas características.

Esta variabilidad da gran valor para mejorar la productividad de la planta y determinados elementos orgánicos del grano. Los principales factores de rendimiento son el número y el peso de los granos.

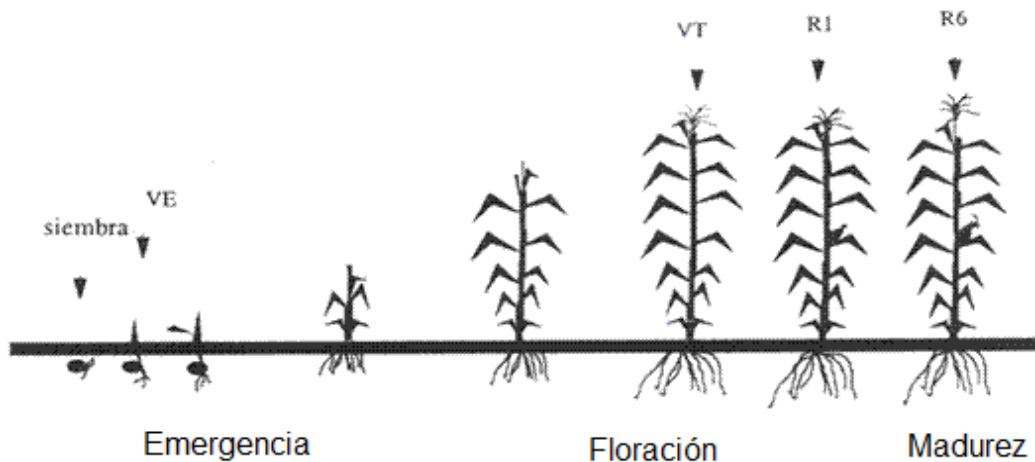


Figura 4. Crecimiento de la planta de maíz

1.3.2 Estructura del grano de maíz

Los granos de maíz se desarrollan mediante la acumulación de los productos de la fotosíntesis, la adsorción a través de las raíces y el metabolismo de la planta de maíz en la inflorescencia femenina llamada espiga. (Organización de las Naciones Unidas 1993)

El grano de maíz es un fruto completo (cariópside), agrícolamente se le conoce como semilla.

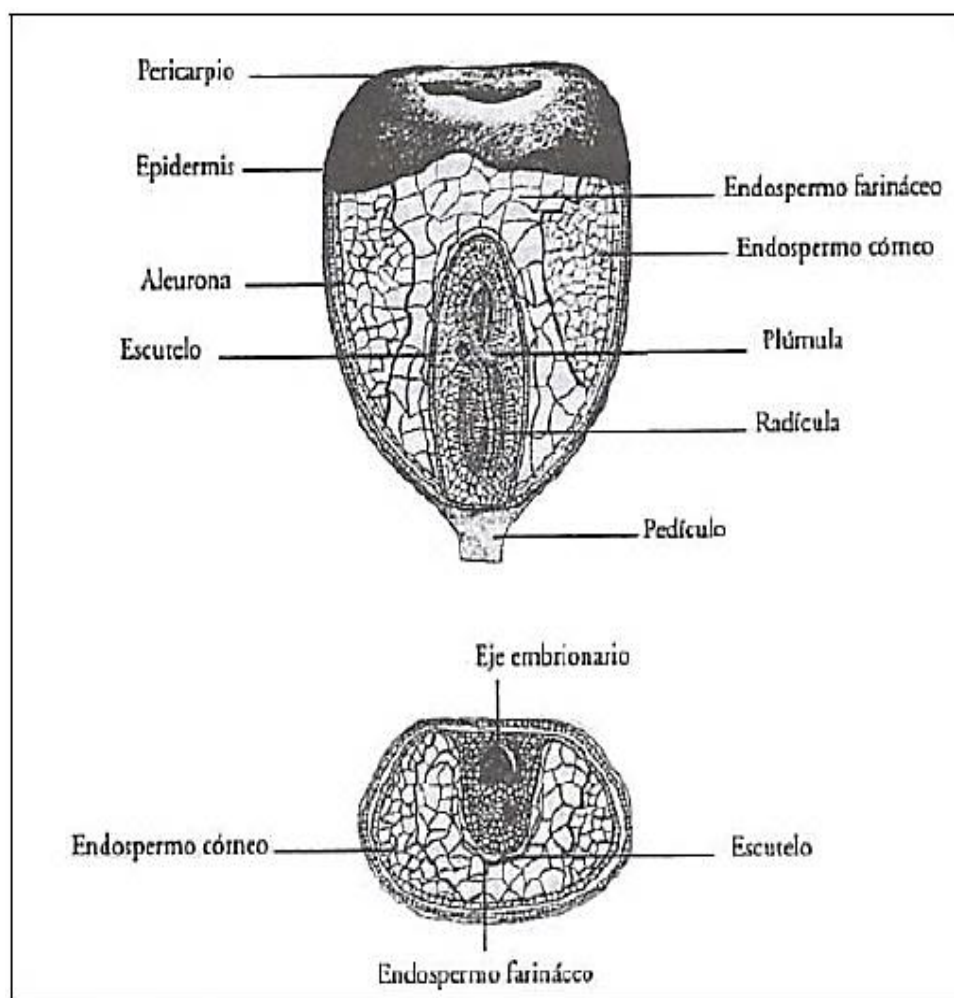


Figura 5. Estructura del grano de maíz corte transversal y corte longitudinal.

El grano está compuesto por las siguientes estructuras:

Salvado (pericarpio y cubierta de la semilla): Cubierta del fruto que rodea al endospermo y al germen. Se encuentra fuertemente unido con las células de aleurona. Contiene la mayor parte de fibra.

Aleurona: Es la capa exterior del endospermo y contiene las enzimas y metabolitos proteínicos para iniciar la germinación. Contiene a las antocianinas en el caso de los maíces pigmentados.

Germen: Es rico en lípidos insaturados. También contiene enzimas, minerales, vitaminas y nutrientes liposolubles como los tocoferoles.

Endospermo: Es e tejido de reserva de a semilla que alimenta al embrión durante la germinación. Contiene gránulos de almidón embebidos en una matriz proteínica.

Hay dos tipos diferenciables en el endospermo, el suave o harinoso y el duro o vítreo, la proporción depende de la variedad de maíz.

El salvado constituye de 5-6% del grano; el contenido de germen es ligeramente mayor, del 10-14 % del grano y endospermo representa el 82% de la semilla. (Hosseney R. 1996)

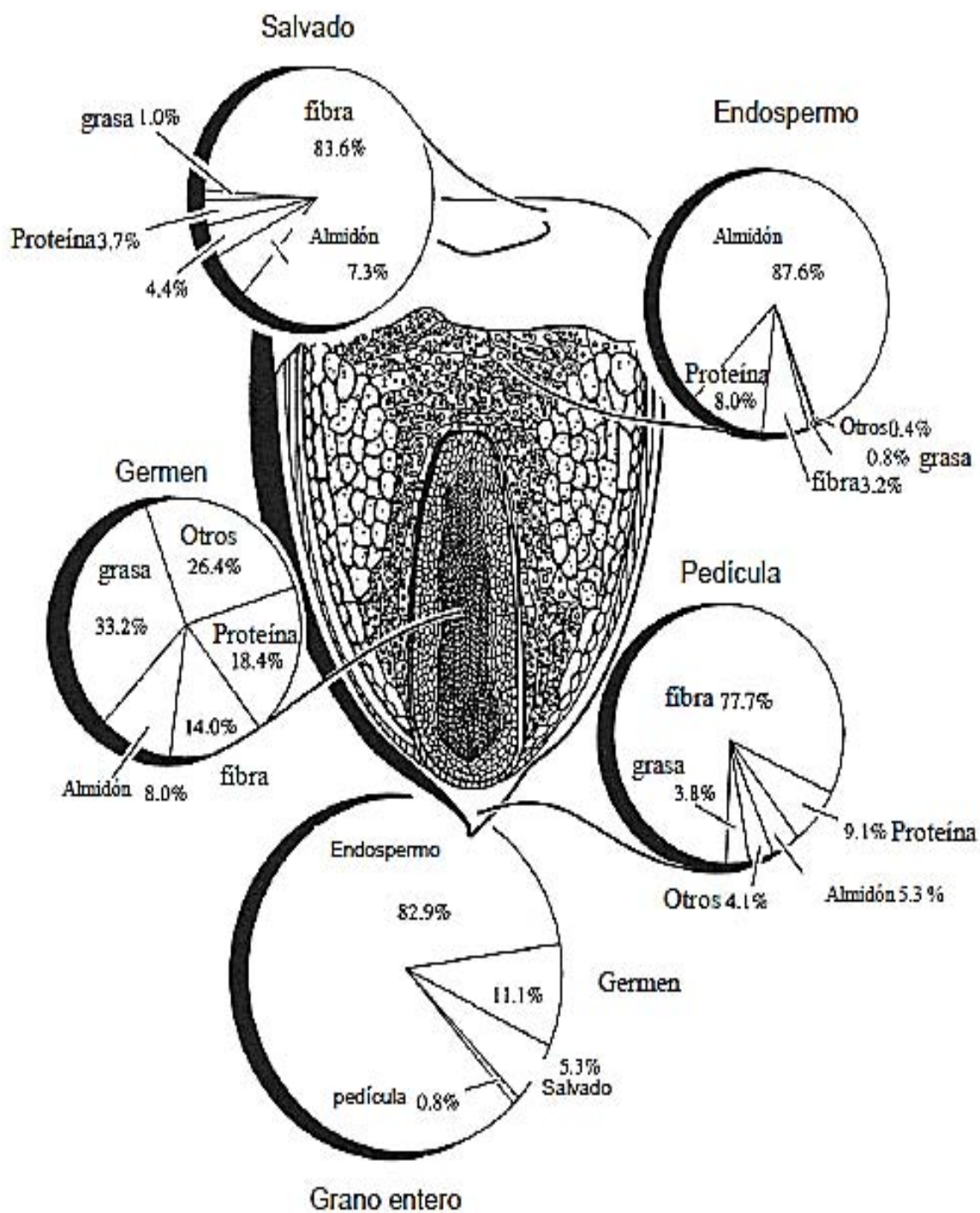


Figura 6. Composición del grano de maíz y sus partes anatómicas (Hosseney R. 1996)

1.3.3 Aplicaciones del maíz

El maíz es un grano que tiene gran cantidad y diversidad de aplicaciones alimentarias e industriales. De particular importancia resulta su condición de materia prima renovable. La diversidad de aplicaciones requerirá de características específicas en la calidad de los diferentes granos, es lo determina principalmente la estructura y composición del grano.

Los granos de maíz nixtamalizado sirven para elaborar diversos alimentos entre los que destacan, las tortillas, atole, pozole, etc. Por otra parte la planta ha sido utilizada íntegramente desde tiempos remotos, igual se utiliza para hacer imágenes religiosas que para alimentar el ganado; sus hojas sirven para confeccionar artesanías; sus tallos sirven para elaborar papel. El olote se usa para hacer desgranadores, pipas, como combustible, etc. Así esta planta ha sido explotada industrialmente, en estos usos destacan la obtención de almidón y de aceites.

Tabla 3 . Tipos de maíz (Gutiérrez-Vite et. al. 2008)

Tipo de maíz	Características	Usos
Duro	<ul style="list-style-type: none"> • Granos redondos, duros y suaves al tacto • Endospermo constituido sobre todo de almidón duro comeo con solo una pequeña parte de almidón blando en el centro del grano • Los granos poseen colores como el amarillo, anaranjado, blanco, crema, verde, púrpura, rojo, azul y negro 	Son preferidos para alimento humano y para hacer fécula de maíz
Dentado	<ul style="list-style-type: none"> • Endospermo con mayor cantidad de almidón blando y el almidón duro está limitado solo a los lados del grano • Grano con apariencia de diente por poseer una hendidura en la corona de la cariósida, pues cuando el grano se comienza a secar, el almidón blando en la parte superior del grano se contrae y produce una pequeña depresión • Es muy susceptible a hongos e insectos en el campo y en el almacenamiento • Poseen granos de color blanco y amarillo 	Para grano y ensilaje (alimentación animal) y usos industriales
Reventón (palomero)	<ul style="list-style-type: none"> • Endospermo duro que ocupa la mayor parte del grano • Los granos son pequeños, con pericarpio grueso y varían en su forma de redondos a oblongos • Cuando se calienta el grano, revienta y el endospermo sale 	Elaboración de palomitas
Dulce	<ul style="list-style-type: none"> • Los granos tienen un alto contenido de azúcar y son de gusto dulce en el momento de la cosecha • Los tipos de maíz de grano dulce son susceptibles a enfermedades 	Para elotes (para consumir mazorcas verdes, ya sea hervidas o asadas)
Ceroso	<ul style="list-style-type: none"> • Su endospermo tiene un aspecto opaco y ceroso. El almidón en los maíces cerosos está compuesto exclusivamente de amilopectina 	Industria refinadora de almidón
Harinoso	<ul style="list-style-type: none"> • El endospermo contiene almidón de naturaleza blanda, por lo que es altamente susceptible a la pudrición y ataque por plagas • Los tipos de maíces harinosos muestran gran variabilidad de n color de grano y textura 	Alimento humano y preparación de platos especiales y bebidas

2.4 Enzimas

Las enzimas son proteínas que se comportan como catalizadores muy potentes y eficaces de las reacciones químicas en los sistemas biológicos, actúan en pequeña cantidad y se recuperan indefinidamente, *in vivo*.

Cada enzima cataliza un solo tipo de reacción y casi actúan sobre un único sustrato o sobre un grupo muy reducido de ellos. (Primo 2007)

Desde el punto de vista fisicoquímico, y como consecuencia de su naturaleza proteica, la actividad catalítica depende del pH y la temperatura de reacción entre otras condiciones, características que resultan importantes para su aplicación.

La International Union of Biochemistry ha establecido un sistema según el cual las enzimas se clasifican en seis grupos, de acuerdo a la reacción que catalicen:

Oxidoreductasas: Reacciones de transferencia de electrones.

Transferasas: Transferencia de grupos funcionales.

Hidrolasas: Reacciones de hidrolisis.

Liasas: Adición a los dobles enlaces.

Isomerasas: Reacciones de isomerización.

Ligasas: Formación de enlaces con la escisión de moléculas de ATP.

1.4.1 Uso de enzimas en la industria.

Durante siglos las enzimas fueron utilizadas, formando parte de células o extractos crudos de materiales vegetales, animales y microbianos. Así sucedió en forma totalmente empírica, sin conocerse su modo de acción, ni el porqué de su actividad catalítica.

El desarrollo de fuentes para producir enzimas de uso en la industria, de métodos de aislamiento y purificación y el diseño de reactores enzimáticos, que permiten su

aplicación en diversos procesos, ha evolucionado en forma considerable y ha dado origen a un área interdisciplinaria conocida hoy día como "ingeniería enzimática", como nuevo enfoque de la biotecnología.

Hoy se ha logrado obtener enzimas más puras, que tienen las siguientes ventajas:

- acción más específica en su función catalítica;
- actividad predecible y controlable, y
- es posible utilizar concentraciones más elevadas del sustrato.

Las principales fuentes de enzimas usadas en la industria son de diferente origen:

a) Vegetal: Lipasas y pectinoesterasa se elaboran a partir de soya, ricino y frutas cítricas; del germen de trigo se extrae la alfa-amilasa. Las proteasas se obtienen de la papaya, del higo, de la piña y la peroxidasa, del rábano picante;

b) Animal: La renina, pepsina, tripsina, quimotripsina, catalasa y lipasa pancreática son de origen animal;

c) Microbiano: Las enzimas de los hongos: *Aspergillus orycae* y *niger* y del *Bacillus subtilis* han demostrado ser de gran uso en la industria.

Algunos ejemplos de las enzimas utilizadas en la industria y su uso se encuentran en la Tabla 4.

Tabla 4. Algunas aplicaciones industriales de enzimas y sus principales usos.

Aplicación	Enzimas utilizadas	Usos
Procesado de alimentos	Amilasas de hongos y plantas.	Producción de azúcares desde el almidón, como por ejemplo en la producción de jarabe de maíz. En la cocción al horno, cataliza la ruptura del almidón de la harina en azúcar. La fermentación de la azúcar llevada a cabo por levaduras produce el dióxido de carbono que hace "subir" la masa.
	Proteasas	Los fabricantes de galletas las utilizan para reducir la cantidad de proteínas en la harina
Industria del papel	Amilasas, xilanasas, celulasas y ligninasas	Degradación del almidón para reducir su viscosidad, añadiendo apresto. Las xilanasas reducen el blanqueador necesario para la decoloración; las celulasas alisan las fibras, favorecen el drenaje de agua y promueven la eliminación de tintas; las lipasas reducen la oscuridad y las ligninasas eliminan la lignina para ablandar el papel.
Industria de detergentes biológicos	Principalmente proteasas, producidas de forma extracelular por bacterias.	Utilizadas para ayudar en la eliminación de tintes proteicos de la ropa en las condiciones de prelavado y en las aplicaciones directas de detergente líquido.

1.5 Extracción asistida con enzimas de compuestos bioactivos de plantas.

Los compuestos bioactivos son metabolitos sintetizados por las plantas para su desarrollo, defensa y otros propósitos y tienen el potencial de ser utilizados por los humanos para una gran variedad de aplicaciones. Compuestos bioactivos esenciales y no esenciales están presentes en una amplia variedad de alimentos (vegetales, algunas frutas y granos) y son consumidos como parte de la dieta del ser humano.

Ha crecido la evidencia de que el uso de compuestos bioactivos puede ayudar a promover una salud óptima y reducir el riesgo de enfermedades crónicas como el

cáncer, enfermedad cardíaca, accidente cerebrovascular y la enfermedad de Alzheimer. (Puri et. al. 2011)

Los compuestos bioactivos se encuentran en bajas concentraciones en los alimentos que los contienen y desafortunadamente las extracciones a base de solventes requieren de largos tiempos de extracción además de que los rendimientos son bajos y los productos finales contienen trazas de solventes orgánicos lo que disminuye su calidad. Por esto se han desarrollado métodos selectivos y eficientes para mejorar su extracción.

La extracción asistida con enzimas de compuestos bioactivos a partir de las plantas es una alternativa potencial a los métodos convencionales a base de solvente. Las enzimas son catalizadores ideales para ayudar en la extracción, modificación o síntesis de complejos de compuestos bioactivos de origen natural.

La extracción asistida con enzimas se basa en la capacidad inherente de enzimas para catalizar las reacciones con una alta especificidad y la capacidad de funcionar bajo condiciones de procesamiento suave en soluciones acuosas. Este método también ofrece la posibilidad de la química verde cuando aumenta la presión sobre la industria para identificar rutas más limpias para la extracción de nuevos compuestos.

La aplicación de enzimas en la extracción de aceite de semillas oleaginosas como el girasol, maíz, coco, aceitunas, aguacate, etc son reportados en la literatura por lo que surge como base para estudiar su funcionamiento para la extracción de otros compuestos.

Las enzimas se utilizan sobre todo para el tratamiento de material vegetal antes de utilizar los métodos convencionales de extracción. Varias enzimas tales como celulasas, pectinasas y hemicelulasas a menudo tienen que irrumpir la integridad de la pared celular de las plantas, mejorando así la extracción de compuestos bioactivos. Estas enzimas hidrolizan componentes de la pared celular lo que aumenta la permeabilidad, lo que se traduce en rendimientos de extracción más altos.

Algunos de los compuestos bioactivos que se obtienen mediante la extracción asistida con enzimas se muestran en la Tabla 5.

En la industria de alimentos en particular, las enzimas son utilizadas para la extracción y clarificación de jugos de frutas, de sabores y pigmentos en el vino y la extracción de aceites.

1.5.1 Extracción de compuestos aromáticos asistida con enzimas.

Los compuestos aromáticos presentes en los alimentos son de gran importancia para la industria por lo que su extracción ha sido objeto de estudio para la mejora de los rendimientos y obtener extractos de mayor calidad.

Los vinos son productos donde la presencia de compuestos aromáticos es un parámetro de calidad, por lo que se ha estudiado la manera de incrementar su concentración. Durante el período de fermentación del mosto, es donde se observa el incremento en los compuestos de aroma y sabor característicos, a través del tiempo se ha encontrado que esto se debe a la presencia de enzimas, que ayudan a su liberación. (Sowbhagya et. al. 2011)

Por esta razón la aplicación de una extracción asistida con enzimas ha sido estudiada para la obtención de vinos con una mayor concentración de compuestos aromáticos. El uso de pectinasas ha demostrado ser eficiente obteniéndose rendimientos del 30 % en comparación con los tratamientos comunes. (Muñoz 2004).

La vainilla también forma parte de los compuestos que se han estudiado para mejorar su rendimiento por medio de la extracción asistida, ya que es de alto costo y sus rendimientos por métodos tradicionales son bajos. El tratamiento de los frijoles de la vainilla con enzimas β - glucosidasas exógenas ha resultado con un 24% de incremento de este compuesto. (Sowbhagya et. al. 2011).

Tabla 5. Compuestos bioactivos aislados mediante extracción asistida con enzimas.

Tipo de producto	Producto	Fuente	Enzimas utilizadas	Máximo rendimiento con enzimas (%)
Aceites y carotenoides	Carotenoides	Semillas de uva	Celulasa, proteasa, xilanasa y pectinasa	17.5
		Flor de caléndula		97
	Aceites volátiles	Cáscara de mandarina	Xilanasas	15
	Caroteno	Zanahoria	Pectinex Ultra SP-L	0.0064
	Licopeno	Tomate	Celulasa y pectinasa	206
	Capsaicinas	Chile	Celulasa, hemicelulasa y pectinasa	n.d.*
Glucósidos	Antocianinas	Cáscara de uva	Pectinex BE3-L	n.d.*
	Azúcar	Residuos de cáscara de uva	Celulasa y pectinasa	0.6377
	Oligosacáridos	Salvado de arroz	Celulasa	39.9
	Almidón	Mandioca	Pectinasa	45.6
	Pectina	Calabaza	Celulasa, β -glucosidasa y pectinesterasa	14.0
Otros	Vainillina	Vaina verde de vainilla	β -glucosidasa y pectinasa	14-21
	Fenoles	Cáscara de cítricos	Celluzyme MX	65.5
	Proteínas	Lentejas y frijoles blancos	Glucosa amilasa	50.3
	Polifenoles	Residuos de uva	Enzimas pectinolíticas	98.1

(* Abreviación n.d. no definido) (Puri et. al. 2011)

1.5.2 Extracción de pigmentos asistida con enzimas

En la actualidad existe una creciente demanda de colorantes a partir de fuentes naturales. Desde que existe la posibilidad de prohibición de colores sintéticos en vista de sus propiedades cancerígenas y ya existe una reducción en el número de colores sintéticos permitidos 13 a 8 (PFA, 2005).

A pesar de las limitaciones de procesamiento y mayores los costos, el mercado mundial de colorantes naturales se ha incrementado rápidamente lo que provoca que cualquier nuevo enfoque que ayude al incremento de la eficiencia de la extracción sea bienvenido cuando se ve en términos del valor agregado del producto final.

El uso de enzimas para mejorar el contenido de estos compuestos se ha probado en la producción de vino tinto y jugo de frutas procesado ya que anteriormente solo se utilizaban para mejorar el rendimiento del prensado y la clarificación, ahora su uso se está expandiendo en diversas aplicaciones más específicas. Una de las líneas de estas aplicaciones más reciente se refiere al uso de preparados de enzimas para mejorar la extracción de los pigmentos (antocianinas) y otros compuestos fenólicos deseables en el jugo o vino tinto. (Anis Arnous 2010)

Se han logrado obtener mediante la extracción asistida con enzimas diversos compuestos encargados de brindar color a las plantas como las antocianinas, clorofila y carotenos, algunos de estos se muestran en la Tabla 6.

Las enzimas más utilizadas para este propósito son las celulasas, alfa amilasa y pectinasa por la composición de los materiales de donde se extraen los colorantes.

Tabla 6. Colorantes naturales obtenidos mediante extracción asistida por enzimas.

Fuente	Color	Enzimas utilizadas	% Incremento respecto a métodos convencionales**
Cártamo	Cartamina	B-glucosidasa	n.d.*
Calendula	Luteina	Celulasa, hemicelulasas y pectinasa 0.01-0.1% w/w	2.5
Chile	Carotenoides	Celulasa, hemicelulasas y pectinasa	11
Alfalfa	Clorofila	Celulasa, hemicelulasas, β -glucanasas, xilanasas, amiloglucosidasa 1%	n.d.*
Uvas rojas	Antocianinas	Pectinasas	10-30
Fresa	Antocianinas	Pectinasa:proteasa (1:1)	28
Frutos secos de aronia	Antocianinas	Celulasas	25
Torta de residuos de arándanos	Antocianinas	Celulasas	n.d.*
Zanahoria	Carotenos	Pectinasa, celulasa	41-49
Ralladura de zanahoria	Carotenos	Pectinasa+hemicelulasa	n.d.*
Tomate	Licopeno	Pectinasa, celulasa	20

(* Abreviación n.d. no definido,**los métodos basados en extracción con disolventes orgánicos). Tabla basada en **(Sowbhagya et. al. 2011)**.

1.5.3 Obtención de Antocianinas mediante extracción asistida por enzimas.

La extracción asistida de antocianinas de uvas rojas ha sido estudiada para observar su efecto en la producción de los vinos. En un estudio realizado se utilizaron 8 preparados comerciales de pectinasas, el efecto del tratamiento fue

evaluado en términos de antocianinas presentes en el jugo fermentado de la uva así como la filtración y tasas de sedimentación.

La liberación máxima de antocianinas se observó a los 7 días por el método de fermentación convencional, mientras que con los tratamientos enzimáticos se observó la reducción de tiempo, obteniendo la máxima liberación a los 5 días.

Además al comenzar la fermentación se observó que el contenido de antocianinas se incrementó en comparación con las muestras control, por lo que además de hacer el proceso más rápido se logró al final del proceso un incremento del 9% en comparación con el tratamiento tradicional. (Sowbhagya et. al. 2011).

En este caso las propiedades de sedimentación y filtración también se vieron favorecidas por el tratamiento enzimático, obteniendo así vinos de mayor calidad sensorial en un menor tiempo.

En otro estudio realizado por (Muñoz 2004) también se realizó la extracción asistida para la obtención de antocianinas a partir de uvas rojas (*V. vinífera*) utilizando la piel, hojas y semillas. La extracción se realizó con agua y solución de enzima al 1% (pectinasas) y se mantuvieron de 37 a 40°C por 6 horas con agitación. Después de esto, el líquido fue decantado (extracto 1) y los residuos desechados, el extracto uno se sometió a una segunda extracción utilizando las mismas condiciones. Ambos extractos se recopilaron para la cuantificación de antocianinas, comparándolos con la extracción sin enzimas, el rendimiento se incrementó hasta un 50%, con esto la extracción asistida con enzimas, resulta un método eficiente para la obtención de antocianinas de las uvas rojas.

Otro ejemplo de obtención de antocianinas por medio de extracción asistida con enzimas, es el de la fresa, en este caso la efectividad del tratamiento se determinó con la cuantificación de antocianinas obtenidas en el jugo de las fresas.

En este caso se utilizaron tres preparados comerciales de pectinasas y proteasas, utilizándolas como un pretratamiento a la obtención del jugo de las fresas. Con esto las antocianinas presentes se incrementaron en un 50%

CAPÍTULO 2

METODOLOGIA

EQUIPOS Y REACTIVOS

- Microbalanza AG245 Máx 41-410g / d= 0.01mg-0.1mg Mettler Toledo
- Agitador orbital con control de temperatura Lab-line Modelo 4629
- Rotavapor R-205 Büchi; Büchi Helating Bath B490
- Espectrofotómetro GBC Cintral de doble haz Modelo 101
- HPLC Waters Modelo 1525 con doble bomba y detector de doble longitud de onda Waters Modelo 2478
- Licuadora Oster® de 5 velocidades
- Lija de grano N° 100
- Tamiz de malla N° 80
- Enzimas: Sternzym EFX Mega (Mühlencemie), α -amilasa (Novozymes), Depol 670L (Biocatalysts), Depol 740 L (Biocatalysts), Celluclast (Novozymes), NS-500010 (Novozymes), NS-500012 (Novozymes), NS-500013 (Novozymes).
- Disolventes orgánicos grado analítico: Metanol y Acetato de etilo (High Purity), ácido acético (Ferm.nt), ácido clorhídrico (J.T. Baker)
- Carbonato de sodio, Fosfato dibásico de sodio, Fosfato monobásico de sodio, Cloruro de potasio, Acetato de sodio, Citrato de sodio (J.T. Baker), ácido cítrico (Sigma-Aldrich)
- Reactivo Folin-Ciocalteu (HYCEL)
- Ácido gálico (Fluka 98%)
- Programa estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI versión 16.1 para Windows

DIAGRAMA GENERAL

ETAPA 1. Preparación de las muestras

Selección de un maíz
criollo colorido



Preparación de las
muestras



Selección de enzimas de
trabajo

ETAPA 2. Extracción de pigmentos



Extracción de pigmentos



Semipurificación del
extracto



Cuantificación de
antocianinas totales.
Método pH diferencial

- a) Extracción con metanol ácido
- b) Extracción asistida por enzimas
- c) Extracción con metanol ácido seguida de una extracción asistida con enzimas
- d) Preparación de muestras control



Determinación de
condiciones de extracción



- a) Determinación de tipo de buffer y pH
- b) Determinación de temperatura de extracción
- c) Determinación porcentaje de enzima para la extracción

ETAPA 3. Determinación de fenoles



Cuantificación de fenoles
totales.
Método Folin-Ciocalteu

ETAPA 4. Determinación de perfil por HPLC



Cuantificación cianidina-3-
glucósido
Cromatografía de líquidos
(HPLC)

ETAPA 1. Preparación de las muestras.

2.1 Selección de una muestra

La selección se hizo a partir de una variedad de maíces criollos provenientes del estado de Tlaxcala. Se seleccionó un solo tipo de maíz, para ello se utilizaron los criterios de intensidad de color y que este se encontrara lo más homogéneamente distribuido en el grano. Estos criterios se tomaron en cuenta por lo descrito en la literatura (Salinas et. al. 2009)

En este caso se utilizó el maíz conocido como maíz morado, de este se obtuvo el pericarpio así como el olote.

2.2 Preparación de las muestras

El pericarpio se obtuvo limando los granos de maíz con una lija de grano número 100, hasta retirar la capa colorida, obteniendo una harina con un tamaño de partícula de malla 80. Se realizó este método al no tener acceso a una máquina perladora que permitiera obtener de una manera estandarizada el pericarpio.

En el caso del olote se realizó una molienda seca de 100g de olote en una licuadora marca Oster® de 5 velocidades, con pulsos de molido de 60 segundos, dejando reposar 30 segundos entre los pulsos para evitar el calentamiento, se obtuvo una harina de tamaño de partícula malla 80.

2.3 Selección de enzimas

La selección se realizó en base a las enzimas disponibles en el laboratorio de trabajo y la composición de las muestras que se utilizaron.

Se utilizaron 4 enzimas o mezclas de enzimas, para las dos muestras durante todo el estudio. Su nombre y composición se observan en la siguiente tabla:

Tabla 7. Enzimas de trabajo seleccionadas

Muestra	Nombre comercial	Composición.	Propiedades
Pericarpio	Sternzym EFX Mega	Esterasas y hemicelulasas	Temperatura 40-60°C Actividad 80 U/g
	α -amilasa	α -amilasa	Temperatura -- Actividad --
	Depol 670L	Celulasas, Pectinasas y Ferul esterases	Temperatura 50-65°C Actividad 1200U/g
	Depol 740L	Ferul esterases	Temperatura 40-65°C Actividad 36 U/g
Olote	Celluclast	Coctel de celulasas	Temperatura 45-60°C Actividad 1200U/g
	NS-500010	Celulasas	Temperatura 40-65°C Actividad 800 U/g
	NS-500012	Celulasas. Xilanasas, Arabinasa y Hemicelulasas	Temperatura 50-60°C Actividad 70 U/g
	NS-500013	Celulasas	Temperatura 40-60°C Actividad 600 U/g

ETAPA 2. Extracción de pigmentos

2.4 Extracción de pigmentos

Para la extracción de los pigmentos se evaluaron tres métodos distintos para cada una de las muestras (olote y pericarpio).

- Extracción con metanol ácido
- Extracción asistida con enzimas
- Extracción con metanol ácido seguida de una extracción asistida con enzimas

a) Extracción con metanol ácido

Se colocaron 100 mg de cada muestra en un matraz Erlen-Meyer de 50 mL, se adicionaron 19 mL de metanol grado reactivo y 1mL de ácido acético grado

reactivo, se puso en agitación durante 24 horas a 170 rpm a una temperatura de 25°C en un agitador orbital. De acuerdo con lo descrito por (Salinas Moreno et. al.2009). El extracto obtenido se concentró en un rotavapor Büchi con control de vacío a una temperatura de 40°C hasta un volumen aproximado de 10 mL para eliminar la presencia de metanol. La extracción se realizó por triplicado para cada una de las muestras.

b) Extracción asistida con enzimas

En este caso se determinaron las condiciones que favorecían la extracción asistida con enzimas realizando algunas variaciones en las condiciones de extracción para el pericarpio y el olote.

- **Pericarpio**

En el caso del pericarpio, las condiciones fueron establecidas en tres etapas distintas y los factores que se modificaron fueron: la solución buffer, el pH, la temperatura y la concentración de enzima, además se utilizaron las diferentes enzimas seleccionadas previamente para esta muestra (sección 2.3).

Las tres etapas en las que se establecieron las condiciones fueron las siguientes:

- 1) Determinación de tipo de buffer y pH: En este caso se utilizaron diferentes buffer (acetatos, citratos y fosfatos) a una concentración 0.1 M y se probaron tres pH distintos (3,4 y 5) para cada uno de ellos. Una vez obtenidos los extractos se realizó la cuantificación de antocianinas totales y se eligieron para la siguiente etapa a los dos buffer que arrojaron los mejores resultados durante la extracción.
- 2) Determinación de temperatura de extracción: Para esta segunda etapa se realizó la prueba de temperatura, donde se probaron 3 condiciones distintas: 25, 30 y 45 °C, en este caso se determinó cuál de estas tres favorecía las condiciones de extracción utilizando nuevamente como parámetro la cuantificación de antocianinas totales. Eligiendo para la última etapa la de mejores resultados.

- 3) Determinación de cantidad de enzima: Durante la última etapa se utilizaron diferentes concentraciones de enzima para la extracción (1,2 y 3% (p/p)), analizando los resultados para cada condición.

La extracción de los pigmentos se realizó pesando 100 mg de la muestra en un matraz Erlen-Meyer de 50 mL, se adicionaron 20 mL de la solución buffer (De acuerdo a la etapa de estudio) y se añadió la cantidad de enzima (1%, 2% y 3%). Se colocó en agitación por 24 horas bajo determinadas condiciones de temperatura (25,30 y 40 °C) en un agitador orbital a una velocidad de 170 rpm.

El extracto obtenido se concentró en un rotavapor Buchi con control de vacío a una temperatura de 40°C hasta un volumen aproximado de 10 mL. La extracción se realizó por triplicado para cada una de las condiciones estudiadas.

- **Olote**

Teniendo como antecedentes los resultados obtenidos para el pericarpio, se decidió analizar sólo el factor pH (3, 4 y 5) con los buffer de acetatos y citratos 0.1M para la muestra de olote. Además de utilizar las enzimas seleccionadas previamente para esta muestra. (Sección 2.3)

La extracción de los pigmentos se realizó pesando 100 mg de la muestra en un matraz Erlen-Meyer de 50 mL, se adicionaron 20 mL de la solución buffer (Acetatos o citratos 0.1M) y se añadió la enzima en un 2%(p/p) Se colocó en agitación por 24 horas a una temperatura de 25°C en un agitador orbital, a una velocidad de 170 rpm.

El extracto obtenido se concentró en un rotavapor Buchi con control de vacío a una temperatura de 40°C hasta un volumen aproximado de 10 mL. La extracción se realizó por triplicado para cada una de las condiciones propuestas.

Al obtener los resultados del análisis de antocianinas totales para las condiciones anteriores, se decidió modificar una parte de las condiciones de extracción para esta muestra, la cual se realizó de la siguiente manera: se pesaron 100 mg de la muestra en un matraz Erlen-Meyer de 50 mL, se adicionaron 20 mL de la solución

buffer (Acetatos o citratos 0.1M) aun pH 4.5 y se añadió la enzima en un 2%(p/p) Se colocó en agitación por 3 horas a una temperatura de 40°C en un agitador orbital, a „una velocidad de 170 rpm. Una vez transcurrido este tiempo se ajusto el pH a 3 y se continuó con la extracción hasta completar las 24 horas a una temperatura de 25°C.

c) Extracción con metanol ácido y posteriormente extracción asistida con enzimas

Para esta extracción se llevó a cabo el método descrito anteriormente para a) *extracción con metanol ácido*, y una vez terminado este proceso la muestra se secó y se colocó en un matraz Erlen-Meyer de 50 mL adicionando 20 mL de solución buffer. En esta extracción se utilizaron los buffer de Acetatos y Citratos a un pH=3 y una concentración 0.1M.

Se colocó en agitación por 24 horas a una temperatura de 25°C en un agitador orbital a una velocidad de 170 rpm.

El extracto obtenido se concentró en un rotavapor Buchi con control de vacío a una temperatura de 40°C hasta un volumen aproximado de 10 mL Las extracciones se realizaron por triplicado para cada una de las condiciones.

2.5 Preparación de control

Paralelamente se realizó la preparación de muestras controles para cada una de las condiciones analizadas en las extracciones asistidas con enzimas.

La extracción de los pigmentos se realizó pesando 100 mg de la muestra (olote o pericarpio según el caso) en un matraz Erlen-Meyer de 50 mL, se adicionaron 20 mL de la solución buffer. Se colocó en agitación por 24 horas bajo determinadas condiciones de temperatura en un agitador orbital, a una velocidad de 170 rpm.

El extracto obtenido se concentró en un rotavapor Buchi con control de vacío a una temperatura de 40°C hasta un volumen aproximado de 10 mL. La extracción se realizó por triplicado para cada una de las condiciones propuestas.

Las condiciones de buffer, pH y temperatura se variaron de acuerdo a la muestra y etapa de estudio.

2.6 Semipurificación del extracto

El extracto se llevó a un embudo de separación donde se agregaron fracciones de 15 mL de acetato de etilo para la remoción de sustancias con una menor polaridad y se realizaron extracciones sucesivas hasta obtener la fase orgánica transparente. Después de esta etapa se concentró el extracto en un rotavapor Buchi con control de vacío a una temperatura de 40°C hasta sequedad.

2.7 Cuantificación de antocianinas totales

La cuantificación se realizó por el método pH-diferencial, este método permite una determinación rápida y precisa de las antocianinas totales aun en presencia de pigmento degradado o algún compuesto interferente.

Para realizar la cuantificación se preparó un buffer a pH 1 de cloruro de potasio 0.025M ajustado con HCL y un buffer a pH 4.5 de acetato de sodio 0.4 M ajustado con ácido acético.

El extracto seco fue reconstituido con agua acidificada con ácido acético al 2% llevándolo a un volumen de 5 mL, de esta solución se tomaron 200 µL y se le agregaron 800 µL de las soluciones buffer.

En las soluciones preparadas se determinó el contenido de antocianinas a dos longitudes de onda diferentes: 1) 510 nm (absorbancia máxima de la antocianina) y 2) 700 nm (lectura de degradación del compuesto y lectura de corrección de sustancias interferentes). Este procedimiento se realizó tanto a pH1 como pH4.5 en celdas de plástico de 1 mL en un espectrofotómetro GBC Cintral.

Para determinar la concentración por este método se aplica la siguiente fórmula:

$$[\text{Antocianina (mg/L)}] = (A) * (PM) * (FD) * (1000) / (\epsilon * l) * (1)$$

Donde:

$$A = (A_{\text{pH } 1.510} - A_{\text{pH } 1.700}) - (A_{\text{pH } 4.510} - A_{\text{pH } 4.5700})$$

PM= Peso molecular de la cianidina-3-glucósido es de 449.2 g/mol

FD= Factor de dilución

ϵ = Absortividad molar, siendo para la cianidina-3-glucósido 26,900

l= longitud de paso de celda en cm.

Se referencio respecto a la cianidina-3-glucósido ya que es la antocianina más abundante encontrada en la naturaleza, además que se ha encontrado en estudios anteriores que existe en proporción mayoritaria en este tipo de maíces (López Martínez, y otros 2009)

ETAPA 3. Determinación de fenoles totales.

2.8 Cuantificación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu

La cantidad de fenoles totales se determinó según el método de Folin-Ciocalteu usando ácido gálico como estándar, para esto se preparó una curva de calibración en un intervalo de concentración de 50 a 500 mg/L ácido gálico (Anexo A).

El procedimiento para la evaluación de fenoles totales fue el siguiente: se mezclaron 2 mL de los extractos con 3 mL de ácido clorhídrico al 0.3% que se mezcló con 2 mL de Na_2CO_3 al 2% por 2 minutos después de los cuales se adicionaron 100 μL de del reactivo Folin-Ciocalteu diluido con agua (1:1), se dejaron reposar por 30 minutos, después de los cuales se leyó su absorbancia a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro GBC Cintral.

Los fenoles totales se expresan como equivalentes en miligramos de ácido gálico (GAE) por gramo de muestra (mg GAE/g).

ETAPA 4. Determinación de perfil de antocianinas por HPLC

2.9 Determinación de perfil de antocianinas por HPLC y cuantificación de cianidina-3-glucósido

Para la cuantificación y determinación del perfil de antocianinas se adecuo el método propuesto por (Fossen, Rune y Oyvind 2001) modificando una de las fases móviles utilizando ácido acético en lugar de ácido fórmico.

Las fases móviles de disolventes fueron A) ácido acético: agua (10:90) y B) metanol: agua: ácido acético (50:40:10 v/v). Utilizando una columna ODS HYPERSIL (250x4.6) a una longitud de onda de 520 nm.

El método utilizado fue: un flujo de 1.2 mL/min con un gradiente de 60% de fase B hasta 100% durante 15 minutos seguido de un flujo isocrático de A durante 23 minutos.

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ETAPA 1. Preparación de las muestras.

La primera etapa de este trabajo consistió en la selección y preparación de las muestras (pericarpio y olote), además de tomar en cuenta sus características para elegir las enzimas para realizar la extracción asistida, a continuación se presentan los resultados obtenidos.

3.1 Selección y preparación de las muestras

La selección del maíz se hizo de una variedad de maíces criollos provenientes del estado de Tlaxcala, de la localidad de Ixtenco que es conocida por la amplia variedad de maíces que se cultivan ahí.

Se seleccionó un solo tipo de maíz, para ello se utilizaron los criterios de intensidad de color y que este se encontrara lo más homogéneamente distribuido en el grano.

En este caso se utilizó el maíz conocido como maíz morado, de este se obtuvo el pericarpio así como el olote del mismo.



Imagen 1. Granos y olote de maíz criollo morado

La muestra de pericarpio, se obtuvo limando el grano de maíz hasta obtener la capa colorida y el olote se sometió a una molienda seca; ambas muestras fueron tamizadas para obtener un tamaño de partícula homogénea. (Imagen 2). La selección de enzimas se presenta en la Tabla 7 de este trabajo.



Imagen 2. Pericarpio de maíz (izq.) y Olote de maíz criollo morado (der.)

ETAPA 2. Extracción de pigmentos

En esta sección se presentan los resultados obtenidos durante la segunda etapa de experimentación, la cual consistió en la extracción de los pigmentos del pericarpio y olote, llevando a cabo tres tipos de extracción para cada una de las muestras, 1) la extracción de pigmentos con metanol ácido, 2) Extracción asistida por enzimas y por último 3) Extracción con metanol ácido seguida de una extracción asistida con enzimas.

La determinación de la concentración de antocianinas totales obtenida para cada una de las extracciones se hizo mediante el método de pH diferencial.

3.2 Determinación de antocianinas totales

3.2.1 Extracción de pigmentos con metanol ácido.

La extracción con metanol ácido es uno de los métodos más utilizados para la extracción de antocianinas (Jing P 2007) por lo que se realizó la extracción utilizando este sistema, esto se efectuó para las muestras de olote y pericarpio; se cuantificó la concentración de antocianinas totales presentes en los extractos los cuales se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentración de antocianinas totales obtenida de la extracción con metanol ácido.

Muestra	Antocianinas totales* (mg/g de muestra)
Pericarpio	5.2346±0.1142
Olote	4.8861±0.1278

* Los datos representan la media y su desviación estándar.

Los resultados obtenidos durante este trabajo son similares a los reportados en la optimización de extracción de antocianinas de corontas de maíz morado de un cultivar de China en soluciones metanólicas en medio ácido encontrando valores cercanos a 6 mg/ g de muestra (Gorriti 2009)

3.2.2 Extracción asistida con enzimas.

- **Pericarpio**

En esta etapa se realizó la determinación de las condiciones de extracción, primero se trabajó con la muestra de pericarpio, las condiciones fueron establecidas en tres etapas distintas y los factores que se modificaron fueron: la solución buffer, el pH, la temperatura y la concentración de enzima.

3.2.2.1 Determinación del tipo de buffer y pH adecuados para la extracción asistida con enzimas del pericarpio de maíz.

En la primera etapa se cuantificó la concentración de antocianinas totales presente en los extractos obtenidos modificando la solución buffer (acetatos, citratos y fosfatos) y el pH (3,4 y 5) de las mismas, los resultados obtenidos se presentan a continuación en la Tabla 9.

La extracción se realizó a una temperatura de 25 °C y un 2% (p/p) de cada una de las enzimas utilizadas para esta muestra, por 24 horas.

Para el buffer de Fosfatos a un pH de 5 se encontraron las concentraciones menores de antocianinas totales, para la muestra control se obtuvo 0.2933 mg/ g de muestra y se observaron pequeñas mejoras con las enzimas como el caso de Depol 740L obteniéndose 0.3008 mg/g de muestra. Para el buffer de acetatos también se obtuvieron concentraciones bajas a un pH de 5 en este caso se obtuvo para la muestra control 3.6991 mg/g de muestra y para el Depol 670L 4.4718 mg/g de muestra que fue la que mostró la mayor, para el caso del buffer de Citratos a pH 5 la mejor concentración que se encontró fue con Depol 670 L con un valor de 4.9874 mg/g de muestra. Con este pH no se logró obtener concentraciones mayores a la que se obtuvo con la extracción de metanol acidificado que fue de 5.2346 mg/g de muestra.

Con la prueba de los buffer a pH 4, las concentraciones de antocianinas mejoraron en comparación con los extractos obtenidos a un pH 5 siendo los mejores valores los obtenidos con los buffer de acetatos y citratos con las enzimas de Sternzym EFX Mega con alfa amilasa, con concentraciones de 4.8904 mg/g y 4.9470 mg/ g respectivamente, observándose una mejora en comparación con las muestras control de un 24% para el buffer de acetatos y un 32% con el de citratos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta primera etapa se observó que los buffer donde se encuentran las concentraciones más altas es en el buffer de acetatos y en el de citratos en un pH de 3 (Figuras 8 y 9), debido a que las antocianinas son más estables a pH bajo. (Rein 2005). Para el buffer de Fosfatos

las concentraciones no mostraron mejoría respecto a lo obtenido con metanol acidificado ya que el mejor resultado para estas condiciones fue de 3.9030 mg/g de muestra, con las enzimas de Sternzym EFX Mega y alfa amilasa, mientras que con el buffer de acetatos si se lograron mejorías respecto al método convencional con concentraciones de 6.7459 mg/g para Sternzym EFX Mega y alfa amilasa, 6.9341 mg/g para Depol 670L y un valor de 7.3810 mg/g con el Depol 740 L. Para el buffer de citratos a pH 3 estos mismos tres tratamientos dieron los mejores valores con concentraciones de 7.5292 mg/g, 7.5381 mg/g y 7.5746 mg/g respectivamente

Hay que tomar en cuenta el pH de la solución ya que la estructura de una antocianina puede variar y esta característica debe ser considerada en estos casos. Aunque el método de pH diferencial el cual fue utilizado para la cuantificación, trabaja con dos diferentes pH y longitudes de onda para tomar en cuenta estos cambios en la estructura de las antocianinas y tratar de hacer correcciones por moléculas que puedan causar interferencia, se trata de tener los extractos en un pH lo más bajo posible para tener la mayor cantidad en su estructura de catión flavilio que es la de color rojo y la de mayor estabilidad. (Rein 2005)

La baja concentración obtenida con el buffer de Fosfatos puede deberse a que este tipo de buffer su rango de amortiguación se encuentra entre 6 y 7 por lo que puede influir para la extracción de las antocianinas utilizando las enzimas ya que es importante que estas se encuentren en un sistema amortiguado por su susceptibilidad a cambios de pH.

Las enzimas que se utilizaron en este trabajo pueden ser inactivadas a un pH cercano a 3 por lo que es posible que no se encuentren trabajando en condiciones óptimas, pero el pH es adecuado para la estabilidad de estos compuestos por lo que se observa una mayor concentración a este pH.

Tabla 9. Concentración de antocianinas totales obtenida del pericarpio de maíz a partir de la extracción con diferentes buffer y pH.**

Enzimas	Buffer	Concentración (mg/g de muestra)		
		pH		
		3	4	5
Control	Fosfatos ^x	3.4518±0.0160 ^b	2.9931±0.0186 ^a	0.2933±0.0266 ^a
Sternzym EFX Mega		3.5044±0.1861 ^b	3.7451±0.2323 ^a	0.1053±0.0104 ^a
Sternzym EFX Mega + α-amilasa		3.9030±0.0904 ^b	3.8053±0.0303 ^a	0.2783±0.0191 ^a
Depol 670L		3.8390±0.0532 ^b	3.5741±0.0206 ^a	0.2963±0.0223 ^a
Depol 740L		3.7899±0.1064 ^b	3.5300±0.1117 ^a	0.3008±0.0212 ^a
Control	Acetatos ^y	4.9991±0.0874 ^b	3.7050±0.2147 ^a	3.6991±0.1054 ^a
Sternzym EFX Mega		5.9120±0.1549 ^b	4.0237±0.1987 ^a	3.7304±0.1614 ^a
Sternzym EFX Mega + α-amilasa		6.7459±0.1478 ^b	4.8904±0.1475 ^a	4.2754±0.1154 ^a
Depol 670L		6.9341±0.1158 ^b	4.6794±0.1412 ^a	4.4718±0.1257 ^a
Depol 740L		7.3810±0.1284 ^b	4.3158±0.1157 ^a	4.3198±0.1146 ^a
Control	Citratos ^y	4.9396±0.0674 ^b	3.9627±0.2417 ^a	4.2084±0.1164 ^a
Sternzym EFX Mega		5.0661±0.1278 ^b	5.2150±0.1245 ^a	4.4139±0.1150 ^a
Sternzym EFX Mega + α-amilasa		7.5292±0.1494 ^b	4.9470±0.1817 ^a	4.9440±0.1146 ^a
Depol 670L		7.5381±0.1232 ^b	4.6847±0.1428 ^a	4.9874±0.1954 ^a
Depol 740L		7.5746±0.1200 ^b	4.6322±0.1137 ^a	4.8571±0.1527 ^a

*Las letras a,b y c indican diferencia significativa entre las muestras de las columnas y las letras x,y indican diferencia significativa entre los bloques.** La concentración de enzima para la extracción fue de 2% y la temperatura de 25°C.

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de rangos múltiples de Duncan ($p < 0.05\%$), teniendo como hipótesis que todos los tratamientos (buffer, pH) tienen el mismo efecto sobre la concentración de antocianinas.

En este caso se determinó que el factor pH tiene efecto sobre la concentración, siendo el mejor pH 3 el que brinda los mejores valores en la concentración. Para el caso de los buffer se determinó que entre acetatos y citratos no existe una

diferencia significativa en los resultados que se obtienen no siendo así para el de fosfatos que como ya se mencionó se obtienen valores menores de concentración.

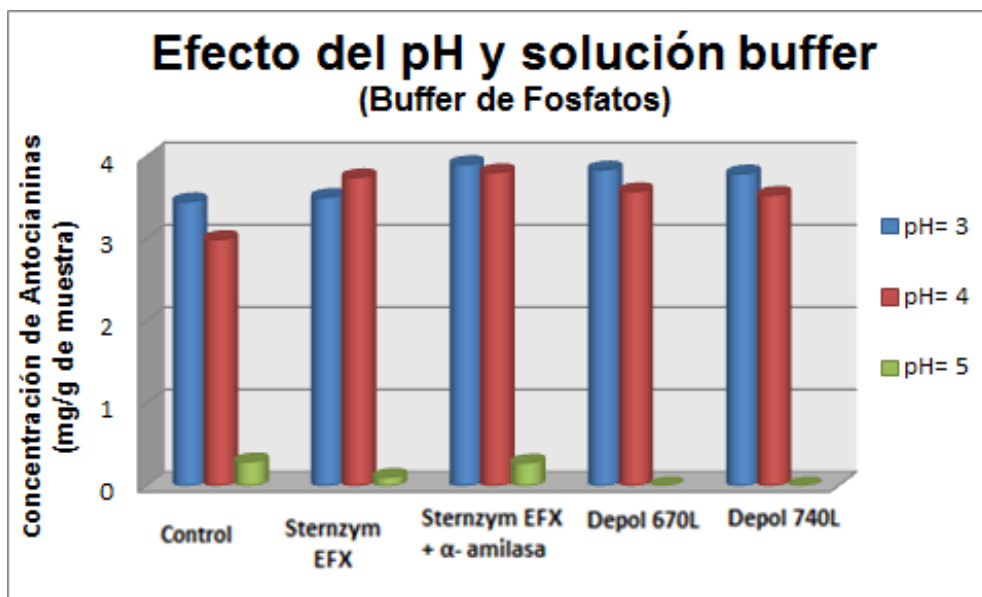


Figura 7. Concentración de antocianinas totales del pericarpio a diferentes pH con buffer de Fosfatos (0.1M)

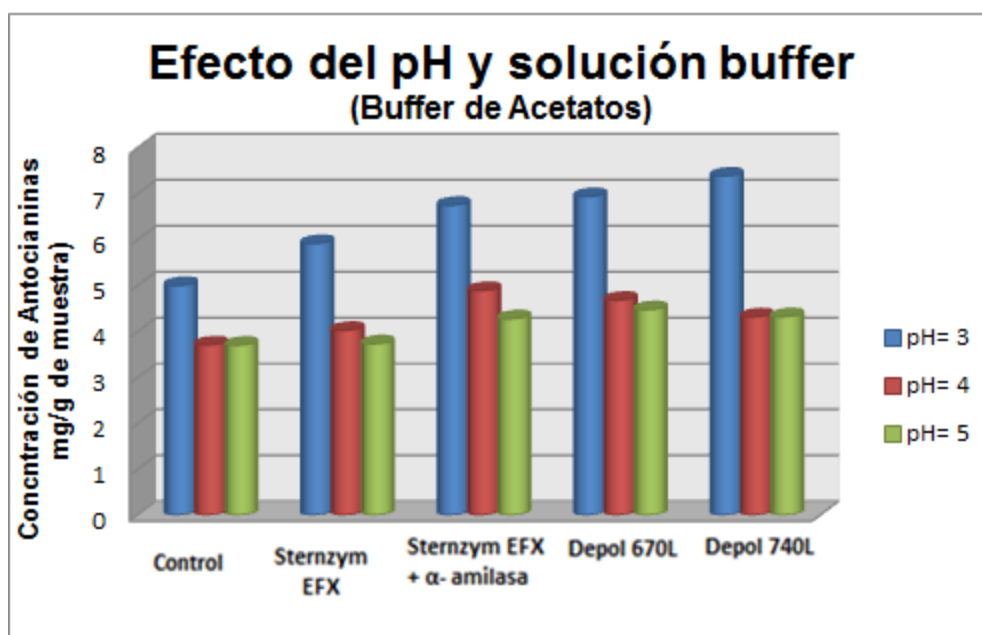


Figura 8. Concentración de antocianinas totales del pericarpio a diferentes pH con buffer de Acetatos (0.1M)

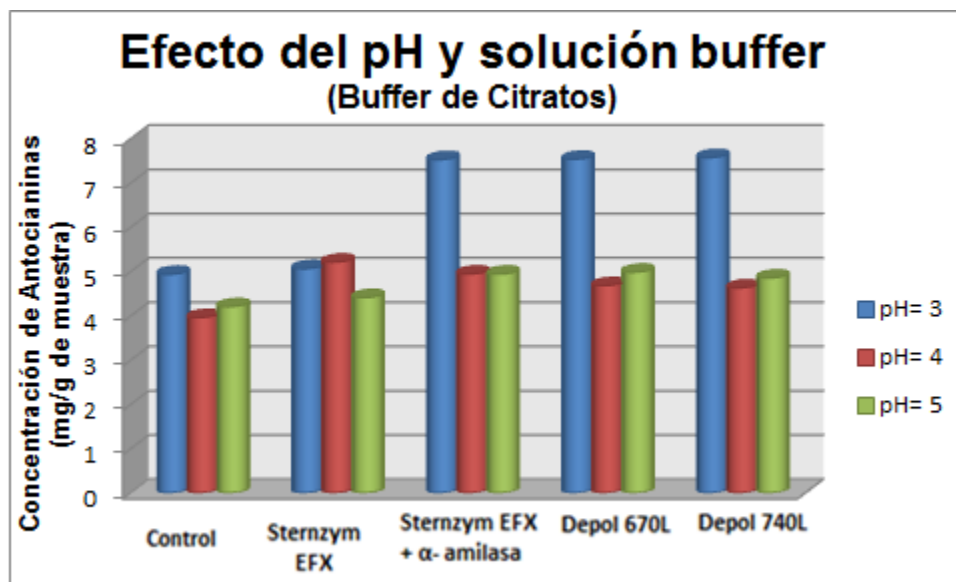


Figura 9. Concentración de antocianinas totales del pericarpio a diferentes pH con buffer de Citratos (0.1M)

Se han realizado extracciones asistidas con enzimas para obtener antocianinas de fuentes naturales, pero no se reporta el uso de soluciones buffer, ya que se observa el efecto de la extracción en los jugos o vinos que se obtienen a partir de las frutas (Sowbhagya et. al. 2011). En el caso de extracciones asistidas para compuestos como ácido ferúlico se ha reportado el uso de buffer de citratos y acetatos con buenos rendimientos. (Puri et. al. 2011)

En el caso del pH en estudios realizados para la extracción de antocianinas de granos de maíz con disolventes como metanol y etanol acidificado se obtuvieron resultados similares a los presentados en este trabajo ya que la mayor concentración de antocianinas se obtiene a pH menores de 3 con concentraciones de 6.8mg/ g de muestra a un pH de 2 (Jing P 2007). En este caso el pH no puede ser menor por las enzimas que se utilizaron para la extracción asistida.

3.2.2.2 Determinación de la temperatura adecuada para la extracción asistida con enzimas del pericarpio de maíz.

De acuerdo a los resultados obtenidos para la prueba de buffer y pH se decidieron utilizar los buffer de acetatos y citratos a un pH de 3, para esta etapa de la experimentación.

Se realizaron las pruebas con diferentes temperaturas de extracción, ya que las temperaturas óptimas para las enzimas que se están trabajando se encuentran alrededor de los 40°C (Cuevas 2008).

Las temperaturas de estudio fueron 25, 30 y 40 °C para las cuales los resultados se presentan en la Tabla 10. Para la temperatura de 25 °C con el buffer de acetatos para la muestra control 4.9316 mg/g de muestra y el mayor rendimiento se observó con el Depol 740 L con un valor de 7.5860 mg/g, para el caso del buffer de citratos ocurrió algo similar ya que se obtuvo un 56% más en el rendimiento de la extracción con el Depol 740 L en comparación con la muestra control que se encontró una concentración de 4.8422mg/ g de muestra.

A los 30 °C no se observó un incremento importante en la extracción en comparación con la temperatura de 25°C. Los mejores resultados a esta temperatura se obtuvieron con Depol 670 y 740 L para ambos buffer de trabajo, con el buffer de acetatos se obtuvo una concentración de 6.7586 mg/g para Depol 670L y 7.3624 para Depol 740 L mientras que para el buffer de citratos un valor de 7.5925 mg/g y 7.5128 mg/g respectivamente.

Con la temperatura de 40°C existió un ligero decremento en la concentración de antocianinas totales en los extractos en comparación con las otras dos temperaturas ya que para el buffer de acetatos la mejor concentración se observó en los extractos tratados con el pool de enzimas 740 L y fue de 5.6223 mg/ g de muestra mostrando un decremento del 30 % en comparación con lo obtenido a los 25 y 30°C, en el buffer de citratos la disminución fue menor alrededor del 3% pero obteniendo un valor de 7.3855 mg/g para el Depol 740 L.

De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 10) se tiene que la mejor temperatura de extracción es a 25°C, ya que si bien no son las condiciones óptimas para las enzimas que participan se debe de tomar en cuenta que las antocianinas son muy susceptibles a temperaturas altas, su degradación se ha reportado a partir de los 40°C. (Torskangerpoll Kjell 2005)

Tabla 10. Concentración de antocianinas totales obtenida de la extracción de pericarpio de maíz a diferentes temperaturas.**

Enzimas	Buffer	Concentración (mg/g de muestra)		
		Temperatura (°C)		
		25	30	40
Control	Acetatos ^x	4.9316±0.1146 ^a	4.7988±0.0716 ^a	4.9150±0.1400 ^a
Sternzym EFX Mega		5.8750±0.0964 ^a	5.9261±0.1411 ^a	5.0088±0.1011 ^a
Sternzym EFX Mega + α-amilasa		6.8156±0.1533 ^a	6.7064±0.1800 ^a	5.4407±0.1579 ^a
Depol 670L		6.7135±0.1273 ^a	6.7586±0.1727 ^a	5.4809±0.1969 ^a
Depol 740L		7.5860±0.1022 ^a	7.3624±0.1158 ^a	5.6223±0.1190 ^a
Control	Citratos ^x	4.8422±0.1763 ^a	5.0423±0.0769 ^a	4.9023±0.1790 ^a
Sternzym EFX Mega		5.2620±0.08546 ^a	5.1160±0.1579 ^a	4.9120±0.1674 ^a
Sternzym EFX Mega + α-amilasa		7.3841±0.1732 ^a	7.4711±0.1095 ^a	7.3066±0.1937 ^a
Depol 670L		7.4131±0.1432 ^a	7.5925±0.1295 ^a	7.3475±0.1021 ^a
Depol 740L		7.6749±0.0865 ^a	7.5128±0.1569 ^a	7.3855±0.2053 ^a

*Las letras a,b y c indican diferencia significativa entre las muestras de las columnas y las letras x,y indican diferencia significativa entre los bloques.** La concentración de enzima para la extracción fue de 2%.

Realizando el análisis estadístico no se observó diferencia significativa entre las temperaturas de extracción, sin embargo se puede observar una ligera disminución en la concentración a 40°C esto puede deberse a que el tiempo de extracción es de 24 horas por lo que el extracto está expuesto a un tiempo prolongado a esta temperatura que como ya se mencionó es cuando comienza la degradación térmica de las antocianinas. (Verbeyst Lise 2010)

Se decidió utilizar la temperatura de 25°C para la etapa posterior ya que no existe un incremento significativo en ninguno de los otros casos por lo que el gasto de energía no estaría justificado, pero si es importante tener en cuenta que la temperatura debe ser controlada ya que al ser una extracción auxiliada por enzimas es necesario controlar este tipo de factores que puedan afectar el proceso.

Según lo descrito por (Sowbhagya et. al. 2011) la extracción de pigmentos asistida por enzimas se ha realizado a una temperatura de 35°C, como en el caso de la vainilla y con ello se han reportado resultados con rendimientos de un 50% más que con los métodos convencionales, en otros casos como la metodología utilizada por (Muñoz 2004) para la extracción de antocianinas a partir de uvas rojas, utiliza una temperatura de 37°C por un período de 6 horas con resultados de 30% de incremento en la extracción. En el caso de este trabajo a una temperatura de 25°C se obtienen rendimientos similares que van hasta el 40%, con temperaturas de 30 y 40°C no se observaron diferencias significativas.

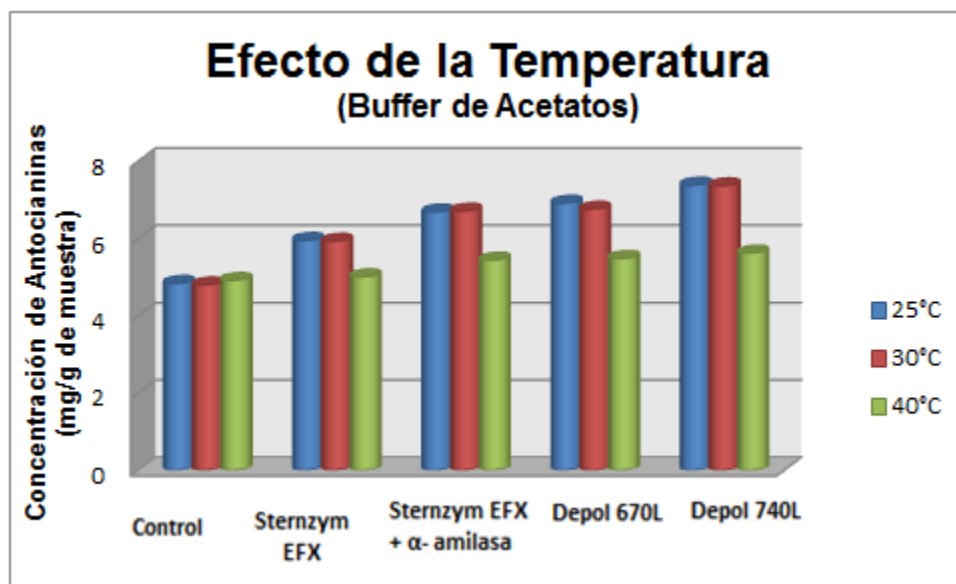


Figura 10. Concentración de antocianinas totales del pericarpio a diferentes temperaturas con buffer de Acetatos (0.1M) pH 3

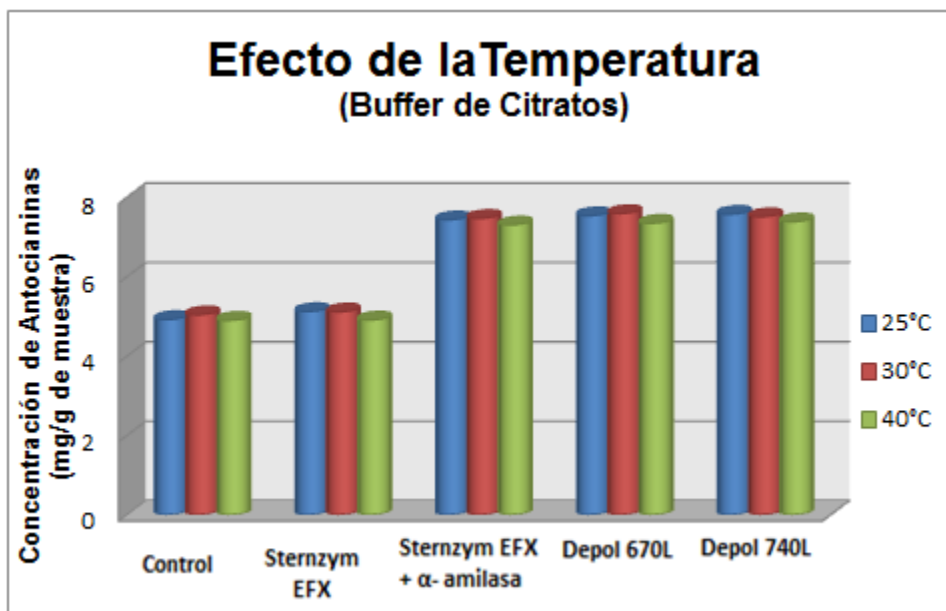


Figura 11. Concentración de antocianinas totales del pericarpio a diferentes temperaturas con buffer de Citratos (0.1M) pH 3

3.2.2.2 Determinación del porcentaje de enzima adecuado para la extracción asistida con enzimas del pericarpio de maíz.

Para la última etapa se realizó una prueba de la cantidad de enzima como se ha realizado en otros estudios de extracción de compuestos naturales asistida con enzimas (Puri et. al. 2011)

Se probaron tres condiciones para este parámetro 1, 2 y 3% (p/p) y se observan los resultados obtenidos en la Tabla 11.

En este caso con un 2% de enzima se observaron incrementos importantes respecto a la muestra control con ambos buffer, en el caso del buffer de acetatos que van desde un 20% con Sternzym EFX Mega hasta un 55% con Depol 740 L.

Tabla 11. Concentración de antocianinas totales obtenida de la extracción del pericarpio de maíz con diferentes concentraciones de enzima. **

Enzimas	Buffer	Concentración (mg/g de muestra)		
		Porcentaje de enzima		
		1%	2%	3%
Control	Acetatos ^x	4.9634±0.1105 ^a	4.8638±0.1190 ^a	4.8562±0.1042 ^a
Sternzym EFX Mega		5.1183±0.1126 ^a	5.7902±0.1126 ^a	5.9507±0.1232 ^a
Sternzym EFX Mega + α-amilasa		5.4846±0.1316 ^a	6.4678±0.1305 ^a	6.7020±0.1432 ^a
Depol 670L		5.5784±0.1358 ^a	6.8965±0.1158 ^a	6.8673±0.1465 ^a
Depol 740L		5.4600±0.1242 ^a	7.5710±0.1284 ^a	7.3721±0.1294 ^a
Control	Citratos ^x	4.9768±0.1653 ^a	4.9224±0.1116 ^a	4.9790±0.1179 ^a
Sternzym EFX Mega		4.9299±0.1263 ^a	5.2320±0.1358 ^a	5.1264±0.1263 ^a
Sternzym EFX Mega + α-amilasa		7.3810±0.1474 ^a	7.3996±0.1579 ^a	7.5367±0.1126 ^a
Depol 670L		7.4220±0.1084 ^a	7.6138±0.1232 ^a	7.5367±0.1063 ^a
Depol 740L		7.4600±0.1137 ^a	7.7761±0.1280 ^a	7.5798±0.1211 ^a

*Las letras a,b y c indican diferencia significativa entre las muestras de las columnas y las letras x,y indican diferencia significativa entre los bloques.**La temperatura de extracción fue de 25°C.

De acuerdo a los resultados arrojados se observó que al utilizar un 1%(p/p) de enzima tanto en el sistema con buffer de acetatos como el de citratos, la concentración se veía reducida ligeramente comparándola con los obtenidos para el 2% de enzima, ya que para el buffer de acetatos la mejor concentración se obtuvo para los extractos obtenidos mediante el Depol 670L, el cual contiene celulasas, feruloilesterasas y pectinasas, que obtuvo un valor de 5.4600mg/g de muestra mientras que para la concentración de 2% (p/p) con este mismo coctel de enzimas que fue de 7.5710 mg/ g de muestra.

Por lo que no es recomendable disminuir la cantidad de enzima en relaciones menores o iguales al 1%(p/p), ya que esto implicaría un incremento mínimo en la concentración de antocianinas, en comparación con la muestra con 2% ya que con este porcentaje se alcanza a mejorar hasta un 50% el rendimiento de la extracción.

Para el caso del aumento en la concentración de enzima a un 3%(p/p), se observa que tampoco es recomendable ya que esto implicaría un aumento en el gasto de enzima y el incremento en la extracción no es significativo en comparación con los resultados obtenidos con una relación del 2%(p/p). Como se pudo observar con el tratamiento de Sternzym EFX Mega (esterasas y hemicelulasas) y alfa amilasa ya que con el buffer de citratos y un 2 % (p/p) se obtuvo un valor de 7.3996 mg/ g de muestra mientras que con el 3% (p/p) que obtuvo un valor de 7.5367 mg/g y este no es el único caso con los cocteles 670 y 740 L ocurrió lo mismo donde solo se observa un ligero incremento entre los resultados obtenidos para un porcentaje de enzima de 2 y 3%.

Que el incremento de la cantidad de enzima no de buenos resultados puede deberse a que a pesar de que las enzimas ayudan a romper los compuestos que integran la pared de las células del pericarpio de maíz, que es donde se encuentran las antocianinas, no se logra con este incremento liberar más colorante.

Como ya se mencionó hay que tomar en cuenta que el pH óptimo para estas enzimas se encuentra entre 5 y 6, alrededor de 3 puede ser inactivadas lo que nos indica que su rendimiento puede que no sea el mejor, pero si se trabaja a un pH mayor las antocianinas sufren cambios estructurales, volviendo los extractos obtenidos muy inestables y más propensos a la alteración por otros factores como la luz y el oxígeno que no fueron controlados durante esta experimentación.

En el estudio realizado por (Thorsten Maier 2008) de la optimización de la extracción asistida con enzimas de antocianinas de uvas rojas, se obtienen los mejores resultados con un porcentaje de enzima del 2%(p/p), con rendimientos del 30% comparados con la muestra control, en este trabajo se obtienen rendimientos mayores del 50% utilizando las enzimas en 2%(p/p), como en el caso de buffer de citratos con Depol 740L (feruloilesterasas) se obtuvo del 57% comprado con la muestra control o con el de acetatos y este mismo pool de enzimas se obtuvo de 55%.

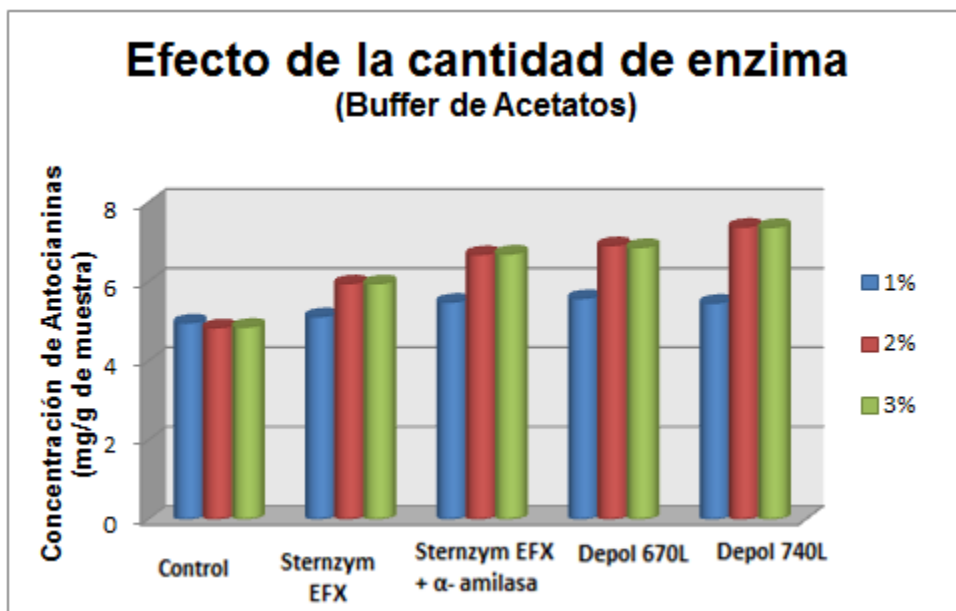


Figura 12. Concentración de antocianinas totales del pericarpio con diferentes porcentajes de enzima con buffer de Acetatos (0.1M) pH 3

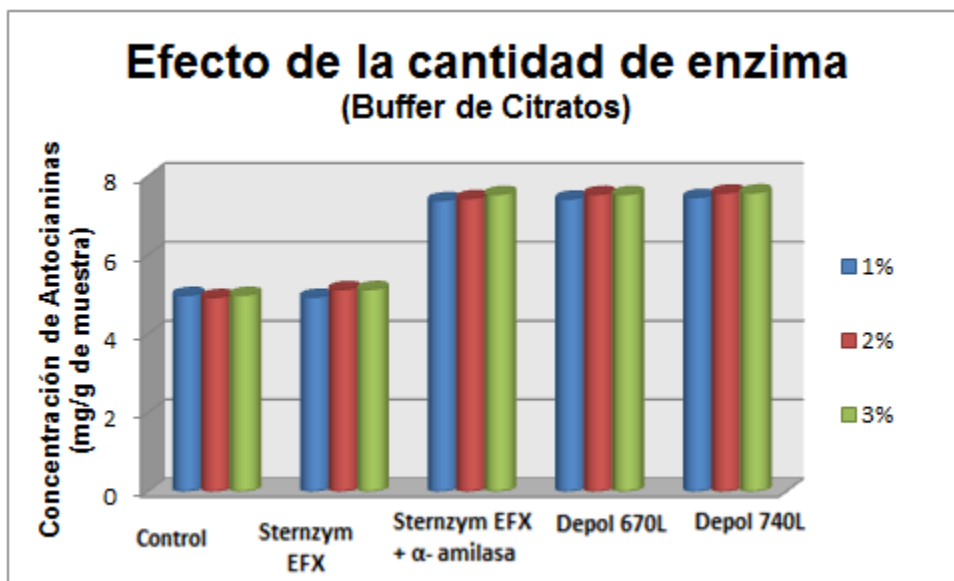


Figura 13. Concentración de antocianinas totales del pericarpio con diferentes porcentajes de enzima con buffer de Citratos (0.1M) pH 3

Después de obtener los resultados para cada uno de los parámetros que fueron modificados para determinar las mejores condiciones de extracción, se establecieron que las más adecuadas para el pericarpio se obtienen con los buffer de acetatos o citratos (0.1 M) a un pH de 3, la temperatura de 25°C y un porcentaje de enzima del 2% (p/p). Durante este trabajo no se modificó el factor tiempo el cual también puede influir en la extracción ya que se puede seguir la cinética de la extracción y disminuir con esto el tiempo requerido para obtener la misma concentración de antocianinas totales en los extractos.

Hay que tomar en cuenta que los mejores sistemas reportados para la extracción de antocianinas que se encuentran en la literatura son en los que se utiliza una solución de metanol ácido, si realizamos una comparación con este sistema, que se ha reportado una concentración de 5.2346mg/ g de harina para el maíz (Aoki, Kuze y Kato s.f.), se observa que el uso de las enzimas mejora la extracción hasta un 50%.

En estudios anteriores (Sowbhagya et. al. 2011) para extraer compuestos bioactivos de plantas por medio de una extracción asistida con enzimas se han obtenido rendimientos del 30 al 50 % para compuestos como polifenoles, antocianinas o carotenos, los cuales son valores similares a los obtenidos en este trabajo.

Se puede decir que el uso de enzimas como las que se utilizaron: hemicelulasas, alfa amilasas y feruloilesterasas, mejoran la extracción ya que ayudan a liberar a las antocianinas, por que estas se encuentran en el maíz que es una matriz compleja.

El uso de feruloilesterasas se realizó ya que se ha observado que las antocianinas pueden formar interacciones intermoleculares con ácidos hidroxicinamicos e hidroxibenzoicos, dentro de los cuales se encuentra el ácido ferúlico, ya que este puede actuar como un copigmento de las antocianinas, El ácido ferúlico se encuentra ligado al pericarpio por enlaces éster, para poder liberarlo es necesario hidrolizarlo químicamente o enzimáticamente (Rein 2005). Las feruloilesterasas,

son enzimas que ocasionan la liberación del ácido ferúlico a través de la hidrólisis del enlace éster; por lo que ayudan a liberar de esta manera a las antocianinas.

Para el caso de los mejores resultados que se observaron fue en primer lugar con Depol 740L compuesto por un coctel de enzimas feruloilesterasas, seguido por Depol 670L que posee un coctel de enzimas como celulasas y feruloilesterasas.

Se utilizó Sternzym EFX Mega y alfa amilasa ya que la manera en que se obtuvo el pericarpio este contenía presencia de almidón y agregando la alfa amilasa se podía disminuir la interferencia del almidón, con esta combinación de enzimas se obtuvo un 42% de incremento sobre el método convencional.

- **Olote**

Para la extracción de antocianinas a partir del olote se utilizaron como referencia los resultados obtenidos para el pericarpio y presentados anteriormente, por lo que se decidió realizar la cuantificación utilizando diferentes pH con los buffer de acetatos y citratos (0.1M) para observar el comportamiento de las enzimas utilizadas para esta muestra que básicamente son celulasas y hemicelulasas, eligiendo este tipo de enzimas de acuerdo a la composición del olote de maíz.

3.2.2.4 Determinación del tipo de buffer y pH adecuados para la extracción asistida con enzimas del olote de maíz.

Los resultados obtenidos para la muestra del olote se presentan en la Tabla 11, en este caso se observó una tendencia distinta en comparación con lo obtenido para la muestra del pericarpio.

No en todas las muestras que llevaron un tratamiento enzimático se observó un incremento en la concentración de antocianinas, comparada con la muestra control, en algunas se pudo notar hasta un decremento (Figuras 14 y 15). Además haciendo la comparación con el método convencional de metanol acidificado que fue de 4.8861mg/g de muestra, no se encontraba ninguna mejoría.

Para este caso ambos buffer (acetatos y citratos) a un pH de 3 fueron las mejores condiciones encontradas en el caso del pericarpio, para la muestra del olote se encontraron valores de 3.9455 mg/g para la muestra control con buffer de acetatos y la concentración más alta de 4.7436 mg/g con el preparado comercial Celluclast, mientras que para el caso del buffer de citratos se encontró en la muestra control una concentración de 4.6027 mg/g de muestra y la más alta fue para el pool comercial NS-500013 con un valor de 4.7532 mg/g de muestra.

La disminución en concentración respecto a la muestra control se observó a un pH de 5 y 4 con el buffer de acetatos, ya que en el caso de la muestra control con un pH 5 se obtuvo 2.0428 mg/g de muestra e con el coctel Celluclast una concentración 1.3047 mg/g teniendo una disminución de 63 %. Para el pH 4 la muestra control presentó una concentración de 2.6686 mg/ g de muestra y con el pool de Celluclast un valor de 1.6880 mg/ g de muestra.

Todo esto se atribuyó a que las enzimas utilizadas para este tratamiento son celulasas y hemicelulasas para las cuales se reporta como condiciones óptimas un pH de entre 5 - 6 y una temperatura alrededor de los 40°C (Sowbhagya et. al. 2011). En este caso el pH de 3 no resultó ser adecuado para realizar la extracción pues las condiciones eran poco favorables para el desempeño de las enzimas.

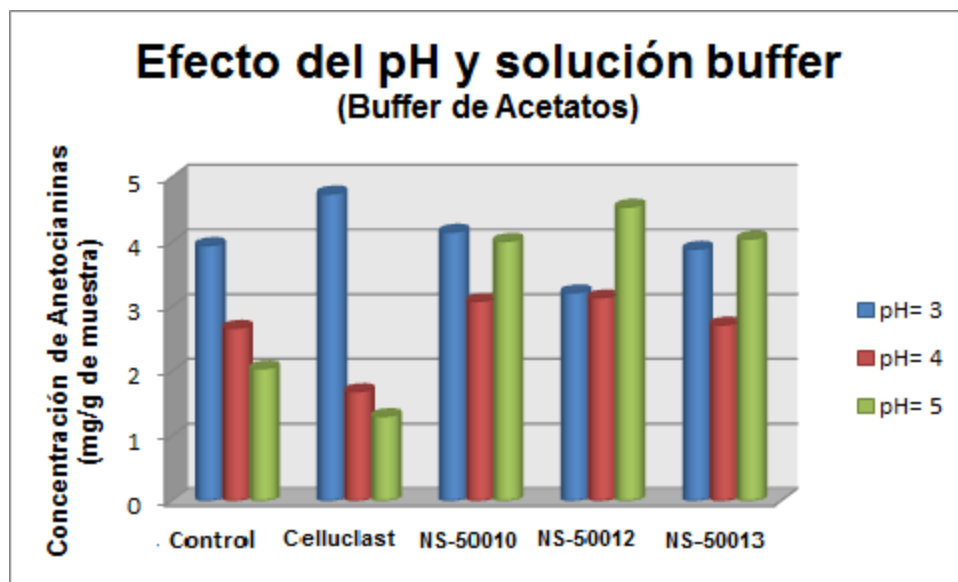
Al realizar la extracción a un pH de 5, un valor cercano al óptimo de las enzimas, la concentración de antocianinas no se vio beneficiada ya que se obtienen concentraciones de 2.0428 mg/g para la muestra control con el buffer de acetatos y la mayor es para el tratamiento con NS-500012 con 4.5399 mg/g a pesar de que el incremento con las enzimas se logra observar no se encuentran valores mayores a los obtenidos con el método convencional. Esto se le atribuyó a que este valor de pH no favorece la estabilidad de las antocianinas ya que en valores de pH entre 5 y 6 la presencia de base carbinol y chalcona son las predominantes, las cuales son especies incoloras.

Tabla 11. Concentración de antocianinas totales obtenida de la extracción del olote de maíz con diferentes buffer y pH. **

Enzimas	Buffer	Concentración (mg/g de muestra)		
		pH		
		3	4	5
Control	Acetatos ^x	2.0428±0.0575 ^a	2.6686±0.0871 ^b	3.9455±0.1381 ^c
Celluclast		1.3047±0.1420 ^a	1.6880±0.1336 ^b	4.7436±0.1054 ^c
NS-500010		4.0105±0.0863 ^a	3.0840±0.1234 ^b	4.1529±0.0974 ^c
NS-500012		4.5399±0.1275 ^a	3.1388±0.0558 ^b	3.2161±0.1325 ^c
NS-500013		4.0463±0.1569 ^a	2.7182±0.0464 ^b	3.8893±0.0827 ^c
Control	Citratos ^x	2.1913±0.0829 ^a	1.3359±0.1097 ^b	4.6027±0.1165 ^c
Celluclast		2.3432±0.0771 ^a	1.4527±0.0862 ^b	4.7436±0.1026 ^c
NS-500010		2.1212±0.1237 ^a	1.4549±0.0529 ^b	4.1529±0.0976 ^c
NS-500012		2.4958±0.0764 ^a	0.8046±0.1466 ^b	3.9463±0.1183 ^c
NS-500013		3.2336±0.1392 ^a	1.8442±0.0818 ^b	4.7532±0.1204 ^c

*Las letras a,b y c indican diferencia significativa entre las muestras de las columnas y las letras x,y indican diferencia significativa entre los bloques.** La concentración de enzima utilizada fue de 2% y temperatura de 25°C.

Se realizó el análisis de varianza multifactorial para el efecto del buffer, pH y las enzimas utilizadas, se observó que no existían diferencias significativas entre los dos buffer que se eligieron. Por lo que se planteó modificar parte de la metodología para la extracción de las antocianinas del olote, pero utilizando los mismos buffer.

**Figura 14.** Concentración de antocianinas totales del olote a diferentes pH con buffer de Acetatos

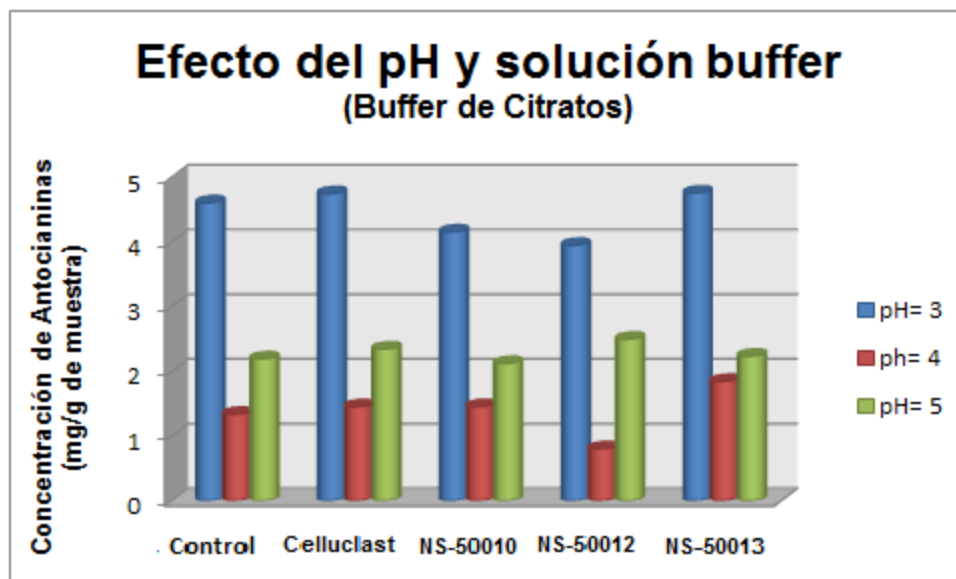


Figura 15. Concentración de antocianinas totales del olote a diferentes pH con buffer de Citratos

La modificación en la metodología se hizo respecto al pH óptimo de las enzimas y para la estabilidad de las antocianinas, así la extracción se dividió en dos partes: 1) utilizando un pH de 4.5 por 3 horas a una temperatura de 40 °C y 2) una vez terminada esta etapa se ajustó el pH y se dejó la extracción hasta las 24 horas a una temperatura de 25°C, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Concentración de antocianinas totales obtenida de la extracción de olote de maíz.

Enzimas	Buffer	Concentración (mg/g)	
		Extracción 1) pH 4.5 por 3h 2) pH 3 por 24h	
Control	Acetatos ^x	5.1228±0.0834 ^b	
Celluclast		5.8280±0.1865 ^a	
NS-500010		5.5702±0.0975 ^a	
NS-500012		7.4696±0.1843 ^a	
NS-500013		7.2195±0.0739 ^a	
Control	Citratos ^x	5.3844±0.1443 ^b	
Celluclast		5.9065±0.1312 ^a	
NS-500010		5.5919±0.1287 ^a	
NS-500012		7.8253±0.0982 ^a	
NS-500013		7.2898±0.0919 ^a	

*Las letras a,b y c indican diferencia significativa entre las muestras de las filas y las letras x,y indican diferencia significativa entre los bloques.

Con el cambio en la metodología se pudo observar una mejora en la extracción, ya que se obtuvo un incremento en la concentración de antocianinas totales en los extractos obtenidos con el tratamiento enzimático.

Los mejores resultados se observaron con el buffer de acetatos y con el buffer de citratos y el preparado comercial NS-500012 obteniendo un 40% de incremento en el rendimiento de la extracción respecto a la muestra control y un 50 % respecto al método convencional de metanol acidificado.(Figura 16). Este preparado comercial contiene enzimas celulasas, xilanasas, arabinasa y hemicelulasas, por esto se le atribuye un mejor rendimiento al contener una variedad de enzimas.

Los resultados obtenidos en este trabajo para el olote de maíz son mayores a los reportados en la extracción de antocianinas de olote de maíz morado en soluciones metanólicas en medio ácido, encontrando valores cercanos a 6 mg/ g de muestra (Gorriti et. al. 2009). Ya que aquí se encontraron valores de 7.4696 mg/g de muestra para el tratamiento con el pool de enzimas NS-500012 y 7.2195 mg/g para el pool NS-500013 con buffer de acetatos; mientras que con el buffer de citratos valores de 7.8253 mg/g de muestra y 7.2898 mg/g de muestra respectivamente.

Además de obtener porcentajes de rendimiento similares a los encontrados en estudios de la extracción de compuestos bioactivos auxiliados con enzimas que están alrededor del 50 % para polifenoles y antocianinas. (Puri et. al. 2011)

Las celulasas y hemicelulasas han sido utilizadas en diferentes materiales vegetales para extraer compuestos de importancia para la industria; tomando en cuenta la composición del olote de maíz que está basada en celulosa, hemicelulosa y lignina, son las más adecuadas ya que estos compuestos funcionan como un secuestrador o barrera estructural que limita la liberación de compuestos como las antocianinas. (Thorsten Maier 2008)

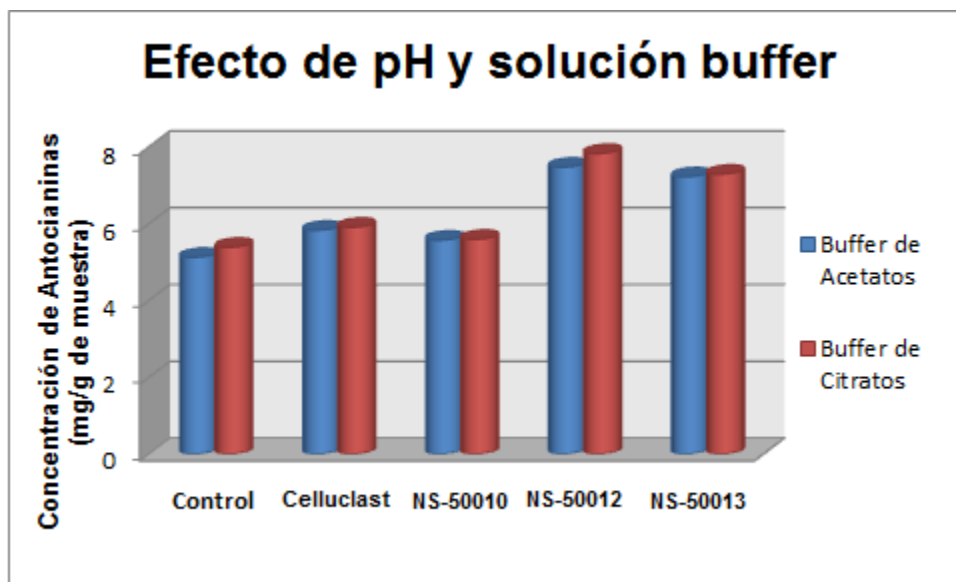


Figura 16. Concentración de antocianinas totales del olote a diferentes pH con buffer de Acetatos y buffer de Citratos.

3.2.3 Extracción con metanol ácido y posteriormente extracción asistida con enzimas

Se realizó la extracción de los pigmentos del olote y pericarpio de maíz con el método convencional (metanol acidificado) y después la muestra se sometió a una segunda extracción la cual fue asistida con enzimas. Esto se efectuó con el fin de observar si de esta forma puede obtenerse una mayor concentración de antocianinas combinando los dos métodos y que la muestra residual quede lo menos colorida posible.

Los resultados obtenidos para el pericarpio se muestran en la Tabla 13 donde se observa que sí se mejora la extracción de los compuestos comparada con la muestra control.

Tabla 13. Concentración de antocianinas totales obtenida de la doble extracción* del pericarpio de maíz.

Enzimas	Buffer	Concentración (mg/g)
		Extracción 1) Metanol 2)Asistida c/ enzimas
Control	Acetatos	6.9369±0.0988
Sternzym EFX Mega		7.5089±0.01127
Sternzym EFX Mega + α-amilasa		7.1001±0.1061
Depol 670L		7.4354±0.1138
Depol 740L		7.2057±0.1196
Control		Citratos
Sternzym EFX Mega	7.5036±0.1035	
Sternzym EFX Mega + α-amilasa	6.8826±0.1191	
Depol 670L	7.3387±0.1033	
Depol 740L	7.1866±0.1066	

* La doble extracción se realizó 1) con metanol acidificado y 2) asistida con enzimas

En la Figura 17 se observa que las enzimas mejoran la extracción de antocianinas del pericarpio de maíz aún después de someter la muestra a un tratamiento con metanol acidificado. Obteniendo un porcentaje mayor al 50 % en casos como las muestras tratadas con Sternzym EFX Mega con ambos buffer.

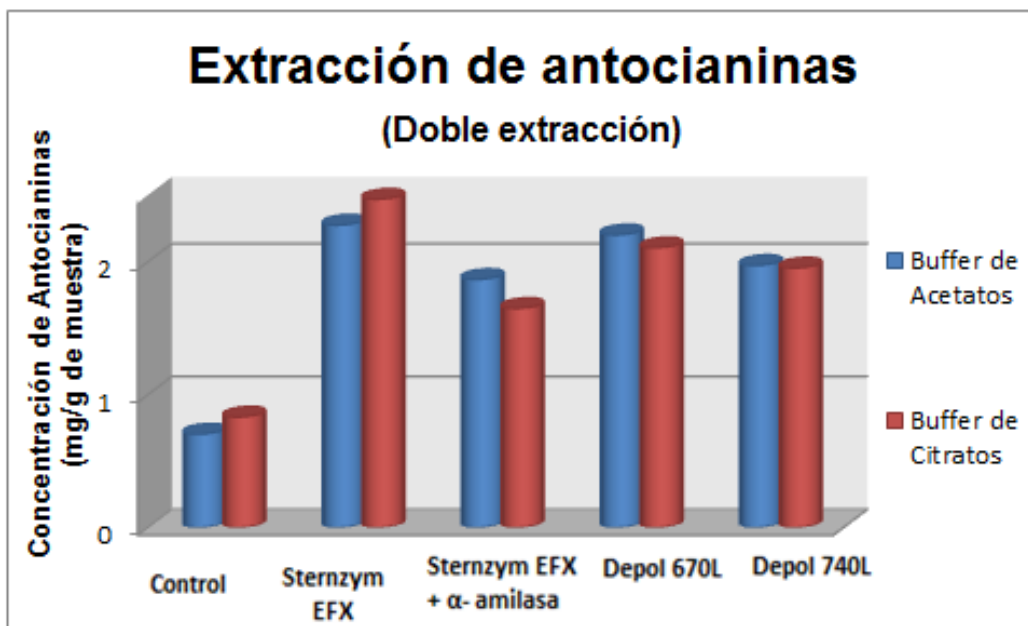


Figura 17. Concentración de antocianinas totales del pericarpio con buffer de Acetatos y buffer de Citratos. (Doble extracción)

En el caso del olote de maíz los resultados se presentan en la Tabla 14, en la cuál se puede observar una tendencia similar a los obtenidos con el pericarpio. Ya que las concentraciones que se obtienen no son mayores a las obtenidas con una sola extracción.

Tabla 14. Concentración de antocianinas totales obtenida a partir de la doble extracción* del olote.

Enzimas	Buffer	Concentración (mg/g)
		Extracción 1) Metanol 2)Asistida c/ enzimas
Control	Acetatos	5.4441±0.1373
Celluclast		7.0308±0.0967
NS-500010		6.0179±0.1177
NS-500012		7.0055±0.1283
NS-500013		6.7505±0.0954
Control	Citratos	5.6592±0.1294
Celluclast		6.7621±0.1235
NS-500010		6.1299±0.0971
NS-500012		6.8902±0.1093
NS-500013		6.7813±0.0832

*La doble extracción se realizó 1) metanol acidificado y 2) Extracción asistida c/ enzimas

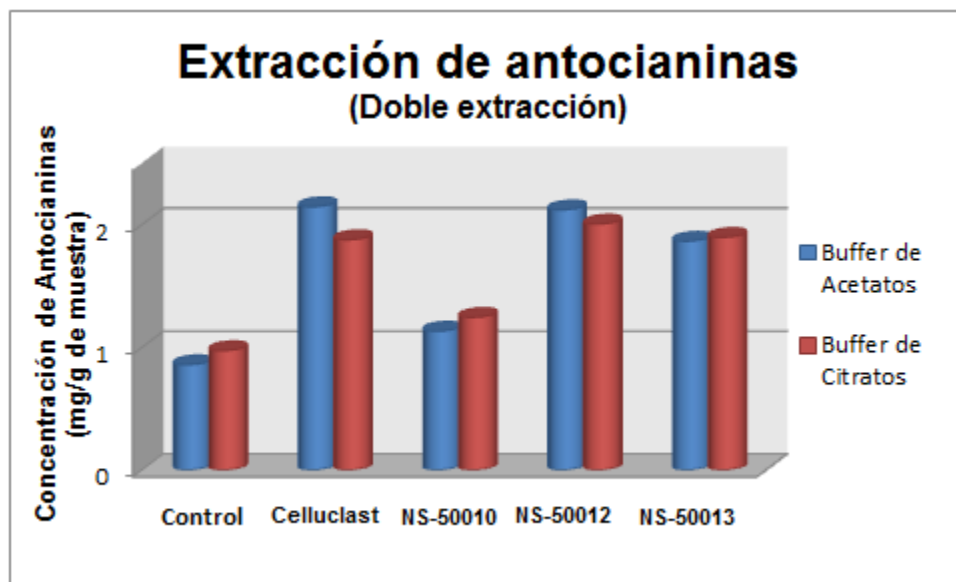


Figura 18. Concentración de antocianinas totales del olote con buffer de Acetatos y buffer de Citratos. (Doble extracción).

De acuerdo a resultados reportados en la optimización de extracción de antocianinas de olote de maíz morado de un cultivar de China en soluciones metanólicas en medio ácido encontrando valores cercanos a 6 mg/ g de muestra (Gorriti 2009), en este caso se logra mejorar la concentración de antocianinas con la segunda extracción que usa enzimas ya que se obtienen concentraciones alrededor de 7 mg/ g de muestra, lo que significa un 20% más a lo reportado con extracción con disolventes orgánicos.

Después de realizar esta extracción para las dos muestras se observó que la concentración de antocianinas totales en los extractos obtenidos por este método no es mayor a la obtenida agregando las enzimas al inicio de la extracción por lo que es posible hacer en un solo paso la extracción asistida con enzimas haciendo así más rápida la extracción y hacer más barato el proceso.

ETAPA 3. Determinación de fenoles totales.

El contenido de fenoles totales se cuantificó en cada una de las muestras según la metodología de Folin-Ciocalteu, se realizó una curva estándar de ácido gálico por lo que los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra.

3.3 Cuantificación de fenoles totales

Los resultados obtenidos para cada uno de los extractos se muestran en las Tabla 15, 16 y 17 para el caso del pericarpio

Los resultados nos muestran una tendencia similar a lo conseguido para las antocianinas, encontrando las concentraciones mayores para fenoles con los buffer de acetatos y citratos a un pH de 3, una temperatura de 25°C y un 2% de enzima, y se observa que el uso de las enzimas favorece la liberación de estos compuestos.

Con buffer de acetatos a pH 3 se encuentran concentraciones de 12.3739 mg GAE/g de muestra para la muestra control y con Depol 670 L un valor de 13.5567 mg de GAE/ g de muestra que es el valor más alto en estas condiciones.

Para el buffer de citratos los valores se encuentran en 12.9312 mg GAE/g para la muestra control y 14.007 mg GAE/g para el tratamiento con Depol 740 L que corresponde al valor más alto.

Cabe mencionar que los resultados bajo estas condiciones presentan valores muy buenos ya que oscilan entre los 12 y 14 mg /g de muestra lo mismo ocurre con los tratamientos a las temperaturas de 30 y 40°C ya que si bien no son los mejores todos se encuentran por arriba de los 10 mg de Acido gálico por gramo de muestra.

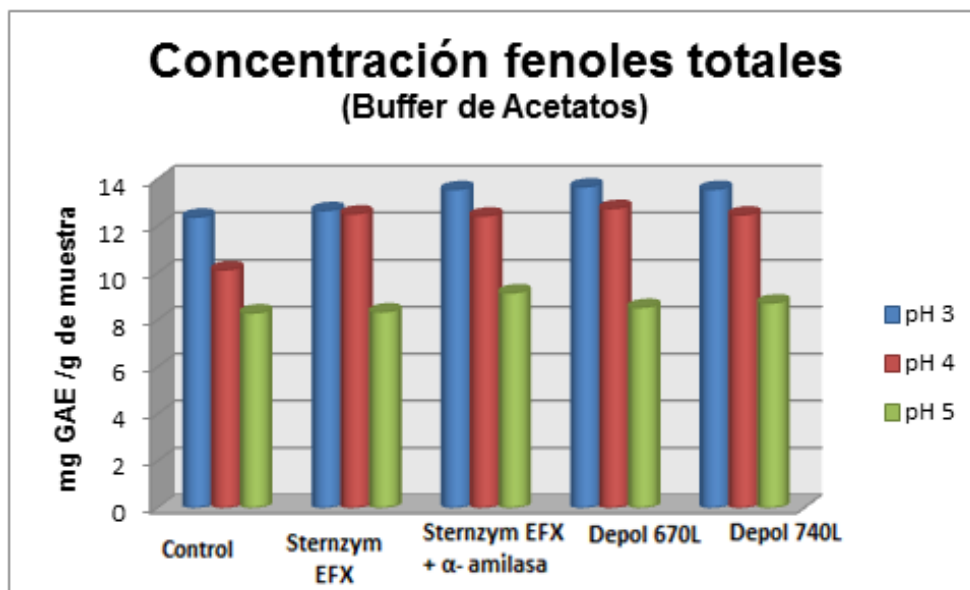


Figura 19. Concentración de fenoles totales del pericarpio de maíz con buffer de Acetatos a diferentes pH.

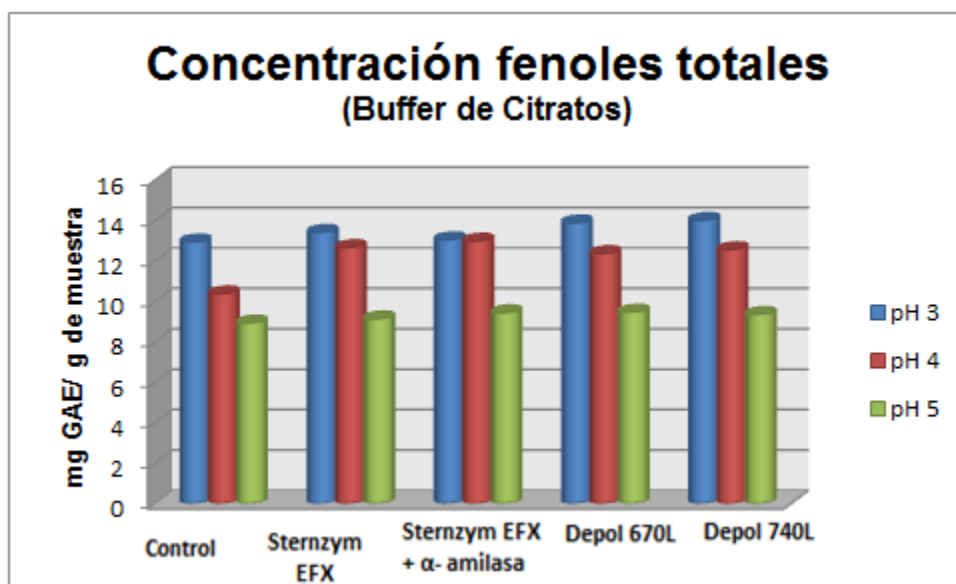


Figura 20. Concentración de fenoles totales del pericarpio de maíz con buffer de Citratos a diferentes pH.

En estudios anteriores de compuestos fenólicos de una muestra comercial de maíz morado por HPLC-DAD en la fracción de acetato de etilo reportan compuestos fenólicos como ácido vanílico, ácido p-coumárico, derivado de quercetina con una concentración de 8.46 mg/g de muestra. (Aoki et. al. 2009)

Se observaron resultados similares a los reportados en este trabajo ya que como se mencionó existen resultados por arriba de los 10 mg de GAE por gramo de muestra en condiciones que si bien no son las mejores arrojan valores como el de 13.8323 mg GAE/g o 13.7866 mg GAE/ g con un buffer de acetatos a pH 3 con una temperatura de extracción de 30 °C, con los pool comerciales Depol 670 y Depol 740L respectivamente. Con el buffer de citratos existen resultados similares como lo es el caso del Depol 740 L con un 3% (p/p) de enzima que se obtiene un valor de 14.0089 mg GAE/g de muestra

Tabla 15. Concentración de fenoles totales obtenida de la extracción del pericarpio de maíz con diferentes buffer y pH.

Enzimas	Buffer	Concentración mg GAE/g de muestra)		
		pH		
		3	4	5
Control	Fosfatos	12.7693±0.1174	9.0658±0.1303	7.9843±0.1543
Sternzym EFX Mega		13.0086±0.1347	10.9834±0.1763	8.2649±0.0986
Sternzym EFX Mega + α-amilasa		13.0945±0.1201	10.7792±0.1265	8.2333±0.1733
Depol 670L		13.1808±0.1217	11.0150±0.1601	8.1374±0.1226
Depol 740L		13.3981±0.0955	11.0411±0.0974	8.1772±0.1349
Control	Acetatos	12.3739±0.1325	10.1317±0.1637	8.2962±0.1005
Sternzym EFX Mega		12.6551±0.1190	12.5098±0.1011	8.3424±0.1548
Sternzym EFX Mega + α-amilasa		13.5458±0.1874	12.4233±0.1461	9.1557±0.1197
Depol 670L		13.6621±0.1557	12.7430±0.1383	8.5322±0.0717
Depol 740L		13.5567±0.1272	12.4674±0.1442	8.7210±0.0839
Control	Citratos	12.9312±0.1285	10.3679±0.0726	8.9199±0.1249
Sternzym EFX Mega		13.4095±0.1142	12.6551±0.1420	9.1301±0.1332
Sternzym EFX Mega + α-amilasa		13.0418±0.1205	12.9743±0.1382	9.4317±0.1228
Depol 670L		13.8799±0.0940	12.3594±0.1657	9.4629±0.1363
Depol 740L		14.0007±0.1124	12.5473±0.1271	9.3478±0.1093

La concentración de fenoles totales obtenida para todas las muestras, nos indica una relación con la encontrada para las antocianinas. Por lo que se observa una mejora en el rendimiento para estos compuestos utilizando la extracción asistida por enzimas, en estudios anteriores se reportan rendimientos del 60% en la mejora de la concentración, como en el caso de la extracción de la cascara de la uva con enzimas pectinasas (Sowbhagya et. al. 2011).

Para observar esta relación de una manera más clara se realizó el análisis de la regresión lineal para estos parámetros, cabe mencionar que la determinación de fenoles totales es la ante sala para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos.

Tabla 16. Concentración de fenoles totales obtenida de la extracción del pericarpio de maíz con diferentes temperaturas y concentración de enzima.

Enzimas	Buffer	Concentración (mg GAE/g de muestra)			
		Temperatura (°C)*		Porcentaje de enzima**	
		30	40	1%	3%
Control	Acetatos	10.6871±0.1882	12.1930±0.1132	10.2841±0.1095	10.7152±0.1056
Sternzym EFX Mega		12.6896±0.1319	13.1501±0.1683	10.3228±0.1562	12.1946±0.0990
Sternzym + α-amilasa		13.5244±0.1423	13.3410±0.1026	10.4019±0.1154	13.0170±0.1853
Depol 670L		13.7866±0.0923	13.4782±0.0988	10.7211±0.0762	13.0849±0.1365
Depol 740L		13.8323±0.1340	14.0117±0.1021	10.8198±0.0962	13.0310±0.1527
Control	Citratos	12.9312±0.1285	12.2226±0.1653	10.4376±0.1065	12.3618±0.1622
Sternzym EFX Mega		13.4095±0.1142	13.8109±0.1254	10.5817±0.1145	13.5732±0.1938
Sternzym + α-amilasa		13.0418±0.1205	13.3445±0.0932	11.0674±0.1783	13.7147±0.1542
Depol 670L		13.8799±0.0940	13.2971±0.1127	11.0989±0.1647	13.6119±0.1947
Depol 740L		14.0007±0.1124	13.8522±0.1238	11.1694±0.0943	14.0089±0.1121

*La concentración de enzima que se utilizó fue de 2%. **La temperatura para la extracción fue de 25°C.

Tabla 17. Concentración de fenoles totales obtenida a partir de la doble extracción del pericarpio

Enzimas	Buffer	Concentración (mg/g)
		Extracción* 1) Metanol 2)Asistida c/ enzimas
Control	Acetatos	2.8745±0.1401
Sternzym EFX Mega		3.0876±0.1480
Sternzym EFX Mega + α-amilasa		2.9654±0.1179
Depol 670L		3.1109±0.1002
Depol 740L		3.0211±0.1321
Control	Citratos	3.0541±0.0839
Sternzym EFX Mega		3.4770±0.1404
Sternzym EFX Mega + α-amilasa		3.5671±0.1204
Depol 670L		3.7754±0.0950
Depol 740L		4.0075±0.1307

*La primer extracción se realizó con 1) metanol acidificado y después 2) Extracción asistida c/ enzimas.

El análisis de varianza de la regresión lineal entre antocianinas y fenoles totales de los diferentes extractos del pericarpio de maíz, obtuvo relaciones altamente significativas con $p < 0.01$ y un $r^2 = 0.6621$. (Figura 21)

Lo que nos indica relaciones importantes entre los fenoles totales presentes en los extractos y las antocianinas, En estudios anteriores (Gorriti 2009) en un análisis de frutos australianos nativos como origen de antioxidantes, se encontró relaciones similares a los encontrados en este trabajo con valores de $r^2 = 0.545$ entre antocianinas y fenoles totales.

Cabe mencionar que la presencia de estos fenoles pueden colaborar en la protección de las antocianinas de una oxidación, por lo que es importante la presencia de estos compuestos en los extractos obtenidos.

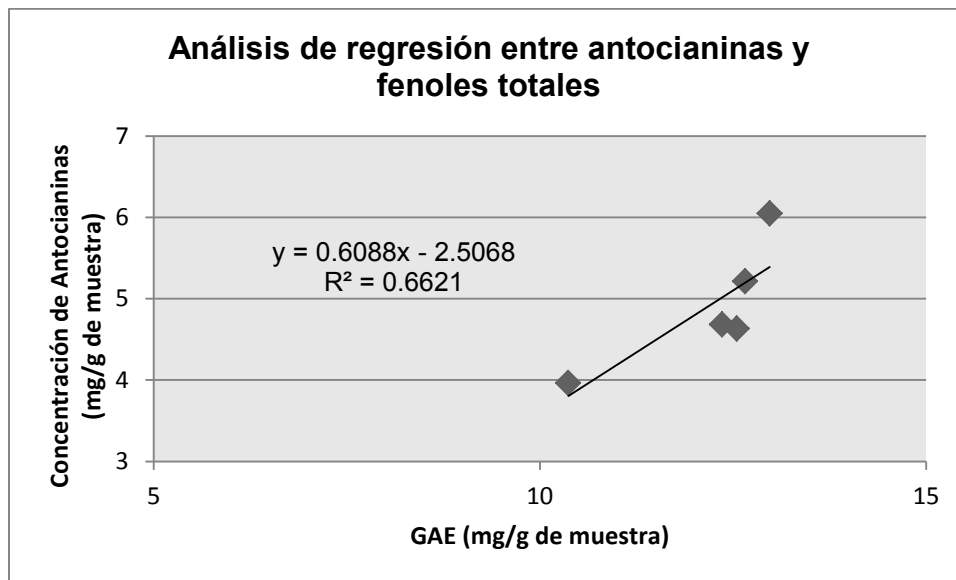


Figura 21. Análisis de regresión entre antocianinas y fenoles totales del pericarpio de maíz.

Para las muestras de olote también se realizó la determinación de fenoles totales en los extractos, se observó la misma tendencia que en la muestra del pericarpio, ya que las mejores condiciones en la extracción de fenoles totales fueron para los buffer de acetatos y citratos a un pH de 3. (Tabla 18 y 19). Se observan valores de 13.4364 mg GAE/ g para la muestra tratada con el pool NS-500012 con buffer de citratos y de 10.6045 mg GAE/ g de muestra para el buffer de acetatos, que reflejan buenos resultados en la extracción de fenoles presentes en la muestra de olote de maíz.

Tabla 18. Concentración de fenoles totales obtenida a partir de la extracción del lote de maíz con diferentes pH.

Enzimas	Buffer	Concentración (mg GAE/g de muestra)		
		pH		
		5	4	3
Control	Acetatos	4.8654±0.1189	5.6970±0.1830	6.6864±0.1562
Celluclast		5.1198±0.1960	5.9482±0.0971	6.6909±0.1048
NS-500010		5.9876±0.1542	5.8327±0.1568	9.4273±0.0888
NS-500012		6.0987±0.1477	6.1227±0.0816	10.6045±0.1026
NS-500013		6.7955±0.1074	6.7544±0.1213	7.6909±0.0857
Control	Citratos	4.8654±0.0923	5.7821±0.1408	8.4182±0.1611
Celluclast		5.1198±0.1334	6.4333±0.1273	10.2864±0.1331
NS-500010		5.9876±0.1452	6.6949±0.1673	12.3409±0.0971
NS-500012		6.0987±0.1105	6.7691±0.0945	13.4364±0.1042
NS-500013		6.7955±0.1047	7.0513±0.1436	9.4545±0.0960

Tabla 19. Concentración de fenoles totales obtenida a partir de la doble extracción del lote.

Enzimas	Buffer	Concentración (mg/g)	
		Extracción 1) pH 4.5 por 3h 2) pH 3 por 24h	Extracción* 1) Metanol 2) Asistida c/ enzimas
Control	Acetatos	10.1181±0.1091	2.9445±0.1013
Celluclast		10.2628±0.1563	3.1176±0.1480
NS-500010		10.4096±0.1154	3.0654±0.1179
NS-500012		10.7231±0.0765	3.1095±0.1008
NS-500013		10.9118±0.0967	3.1281±0.1321
Control	Citratos	10.4761±0.1060	3.1591±0.0879
Celluclast		10.5817±0.1143	3.4950±0.1446
NS-500010		11.0674±0.1787	3.5713±0.1207
NS-500012		11.1189±0.1649	3.8794±0.0930
NS-500013		11.0394±0.0948	4.0115±0.1017

*La primer extracción se realizó con 1) metanol acidificado y después 2) Extracción asistida c/ enzimas.

Para estos resultados también se realizó el análisis de varianza para la regresión lineal, donde se observó la relación significativa entre estos dos parámetros, se obtuvo relaciones altamente significativas con $p < 0.01$ y un $r^2 = 0.7919$, esto se observa en la Figura 22.

Con todo esto se puede inferir que las antocianinas son una parte importantes de los fenoles presentes en la muestras (olote y pericarpio) del maíz morado utilizado en este trabajo.

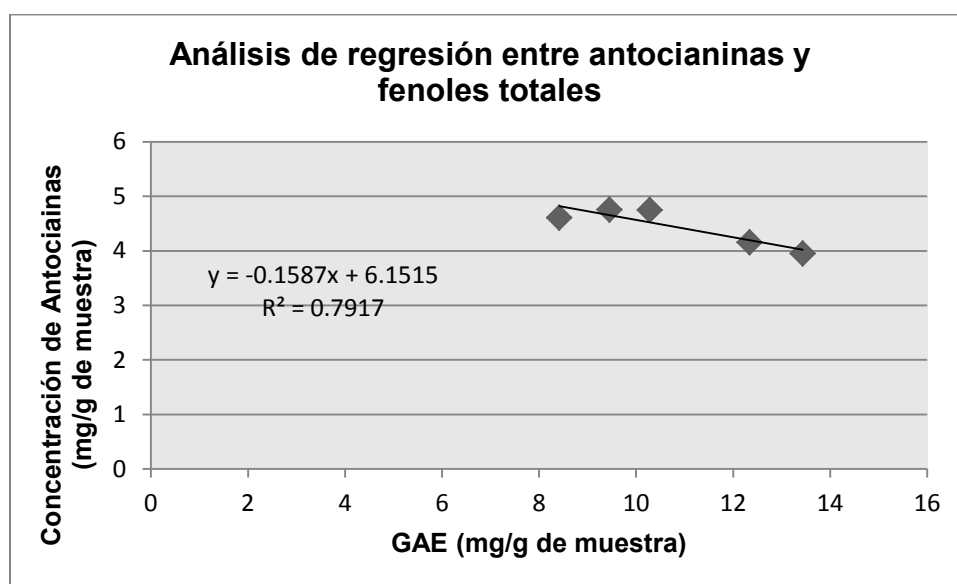


Figura 22. Análisis de regresión entre antocianinas y fenoles totales del olote de maíz.

Como ya se mencionó la presencia de estos compuestos fenólicos pueden estar colaborando evitando la oxidación de las antocianinas de los extractos obtenidos además de colaborar con la capacidad antioxidante que pueden presentar brindando una característica adicional a los extractos.

ETAPA 4. Determinación de perfil de antocianinas por HPLC

Para la última etapa se realizó la determinación del perfil de antocianinas por medio de sus tiempos de retención además de llevar a cabo la cuantificación de la

antocianinas más comúnmente encontrada en la naturaleza que es la cianidina-3-glucósido.

3.4 Determinación de perfil de antocianinas por HPLC

Para determinar las antocianinas presentes en los extractos obtenidos, se realizó su análisis por medio de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).

Además de observar cualitativamente la presencia de las antocianinas utilizando su Rf reportado en estudios anteriores, se realizó la cuantificación de la cianidina-3-glucósido, que es la más común en la naturaleza. (López et. al. 2000)

Los resultados obtenidos para la cuantificación de la cianidina-3-glucósido se observan en las Tablas 20, 21 y 22 para la muestra de pericarpio, cabe resaltar que no en todos los extractos se observó la presencia de esta antocianina o se encontraba fuera de los límites de detección del equipo.

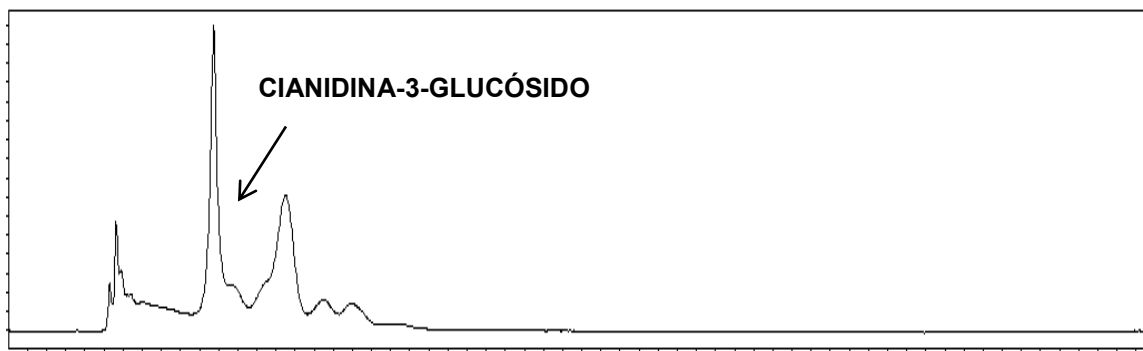


Imagen 3. Cromatograma obtenido para la muestra control de pericarpio, extracción con buffer de acetatos, pH=3, 25°C.

Tabla 20. Concentración de cianidina-3-glucósido obtenida del pericarpio de maíz a diferentes pH.

Enzimas	Buffer	Concentración mg/g de muestra)		
		pH		
		5	4	3
Control	Fosfatos	ND*	ND	ND
Sternzym EFX Mega		ND	ND	ND
Sternzym EFX Mega + α -amilasa		ND	ND	ND
Depol 670L		ND	ND	ND
Depol 740L		ND	ND	ND
Control	Acetatos	ND	2.0869	2.4493
Sternzym EFX Mega		ND	2.1578	3.5408
Sternzym EFX Mega + α -amilasa		ND	2.2794	3.0606
Depol 670L		ND	2.0957	3.3610
Depol 740L		ND	2.2123	3.9746
Control	Citratos	ND	2.1870	2.8794
Sternzym EFX Mega		ND	2.2420	3.2816
Sternzym EFX Mega + α -amilasa		ND	2.2110	3.4969
Depol 670L		ND	2.3745	3.4115
Depol 740L		ND	2.2936	3.8772

*ND= No detectado

Se observó que en las muestras donde existe una concentración mayor de cianidina-3-glucósido fueron las tratadas con buffer de acetatos y citratos a un pH de 3, como en el caso de la cuantificación de antocianinas totales. En este caso se obtuvo 3.9746 mg/g de muestra, para el tratamiento con el pool enzimas Depol 670L con el buffer de acetatos. Existe un incremento en la concentración de la cianidina del 60% en comparación de la obtenida con la muestra control. En general se observa que el tratamiento enzimático ayuda a la extracción lo cual se observó en la cuantificación de antocianinas totales y esto se ve reflejado en la concentración obtenida para una en particular en este caso la cianidina-3-glucósido, lo cuál puede favorecer si se requieren obtener extractos de un tipo de antocianina en específico para comercializarse.

Tabla 21. Concentración de cianidina-3-glucósido obtenida a partir de la extracción del pericarpio de maíz a diferentes temperaturas y concentración de enzima

Enzimas	Buffer	Concentración (mg/g de muestra)			
		Temperatura (°C)		Porcentaje de enzima	
		30	40	1%	3%
Control	Acetatos	2.1192	ND***	ND	2.2848
Sternzym EFX Mega		3.0410	ND	ND	2.2977
Sternzym + α-amilasa		3.1203	ND	ND	2.4670
Depol 670L		3.3155	ND	ND	2.5043
Depol 740L		3.8544	ND	ND	2.2482
Control	Citratos	2.1741	ND	ND	2.0541
Sternzym EFX Mega		3.0081	ND	ND	2.1521
Sternzym + α-amilasa		3.3321	ND	ND	2.2858
Depol 670L		3.1215	ND	ND	2.2455
Depol 740L		3.7472	ND	ND	2.1844

*La concentración de enzima que se utilizó fue de 2%. **La temperatura para la extracción fue de 25°C.*** ND= No determinado

Tabla 22. Concentración de cianidina-3-glucósido obtenida de la doble extracción del pericarpio

Enzimas	Buffer	Concentración (mg/g)
		Extracción* 1) Metanol 2)Asistida c/ enzimas
Control	Acetatos	2.8745±0.1401
Sternzym EFX Mega		3.0876±0.1480
Sternzym EFX Mega + α-amilasa		2.9654±0.1179
Depol 670L		3.1109±0.1002
Depol 740L		3.0211±0.1321
Control	Citratos	3.0541±0.0839
Sternzym EFX Mega		3.4770±0.1404
Sternzym EFX Mega + α-amilasa		3.5671±0.1204
Depol 670L		3.7754±0.0950
Depol 740L		4.0075±0.1307

*La primer extracción se realizó con 1) metanol acidificado y después 2) Extracción asistida c/ enzimas.

En las muestras donde no se determinó la presencia de la cianidina-3-glucósido se observó una tendencia similar entre ellas, ya que al hacer la comparación con (Fossen et. al. 2001) en el caso de estos maíces se pueden identificar las antocianinas por el orden de elución: pelargonidina-3-glucosido, cianidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido, en este caso no se observó un tiempo de retención constante ya que las fases móviles utilizadas son Fase A, Ácido acético : Agua (90:10) y como Fase B, metanol: agua: ácido acético (50:40:10 v/v), por lo que la concentración de ácido acético es muy alta y no permite que se establezca por completo la columna y los tiempos de retención se vean afectados.

En la Imagen 4 se observa el cromatograma obtenido para el tratamiento con Sternzym EFX Mega con buffer de acetatos y un 1% de enzima a 25°C, dónde se observa el pico con un tiempo de retención de 7 minutos, que se le atribuyo a la peonidina-3-glucósido, con esto se obtuvo un porcentaje de área de 38.89% que comparándola con la obtenida para la muestra control que se obtuvo un 34.70%, con esto el tratamiento enzimático muestra un incremento del 12% específicamente para esta molécula, para este caso no se logró cuantificar la cianidina-3-glucósido pero si se observa la presencia de la peonidina-3-glucósido y su incremento con el tratamiento enzimático. Esto es posible observarlo en todas las muestras en las que no se pudo cuantificar la cianidina.

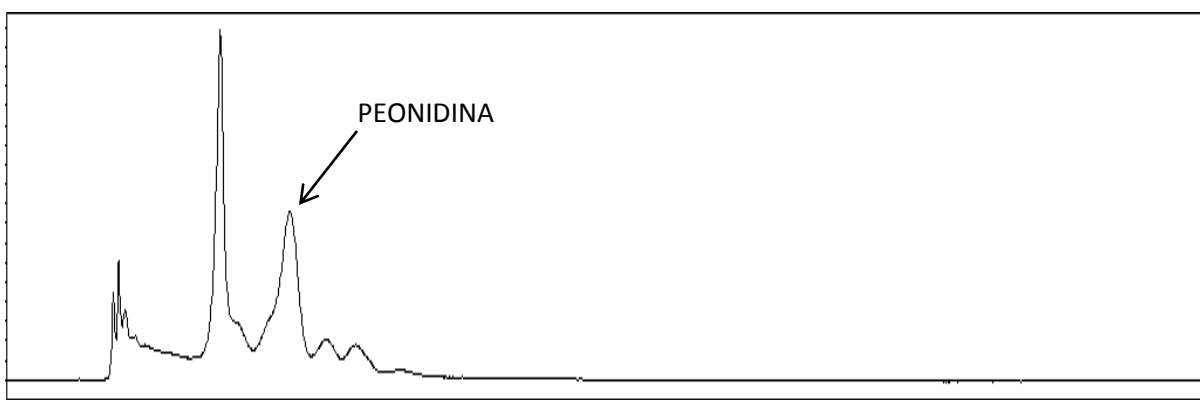


Imagen 4. Cromatograma obtenido para la muestra de pericarpio con Sternzym EFX Mega, extracción con buffer de acetatos, pH=3, 25°C y 1% de enzima.

Para las muestras de olote se realizó la misma determinación para los extractos obtenidos, estos se muestran en la Tabla 23 y 24, ocurre algo similar que con el pericarpio, existen muestras donde no se observa la presencia de cianidina pero es posible observar el incremento de la peonidina-3-glucósido.

En este caso del olote de maíz los mejores resultados para cianidina-3-glucósido se observaron con el ajuste del pH a las 3 horas, obteniendo una concentración de 3.8021 mg/g de muestra para el tratamiento con NS-50012 con buffer de citratos. Esto indica que la cianidina representa 48% de las antocianinas totales extraídas.

También se muestra en la Imagen 5 el cromatograma para la extracción con el buffer de citratos a pH 3 con el pool de enzimas NS-50012, aquí se observó el incremento en la peonidina en comparación con la muestra control obteniendo una abundancia relativa del 60%. Con esto podemos decir que a pesar de que no se consigue una mejora en la extracción de antocianinas totales se busca obtener la peonidina esta podría ser una buena técnica.

Tabla 23. Concentración de cianidina-3-glucósido obtenida a partir de la extracción del olote de maíz a diferentes pH.

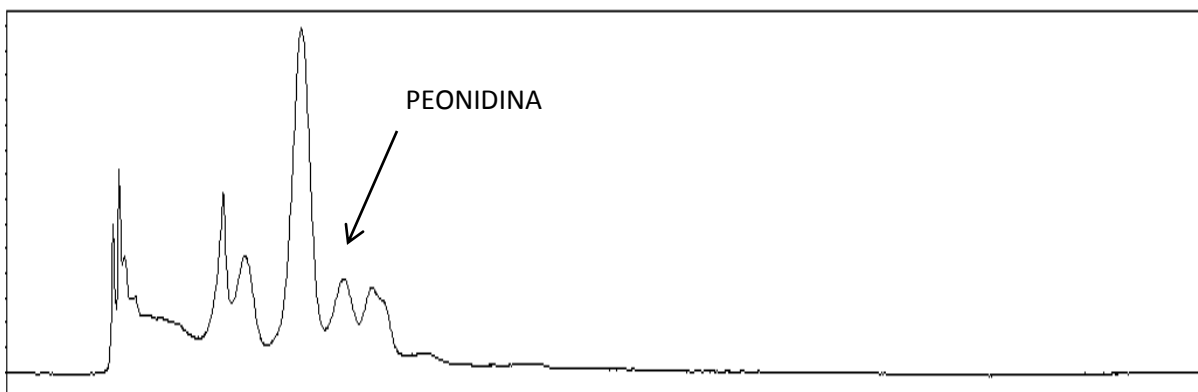
Enzimas	Buffer	Concentración (mg/g de muestra)		
		pH		
		5	4	3
Control	Acetatos	ND*	ND	ND
Celluclast		ND	ND	ND
NS-500010		ND	ND	ND
NS-500012		ND	ND	ND
NS-500013		ND	ND	ND
Control	Citratos	ND	ND	ND
Celluclast		ND	ND	ND
NS-500010		ND	ND	ND
NS-500012		ND	ND	ND
NS-500013		ND	ND	ND

*ND= No determinado

Tabla 24. Concentración de cianidina-3-glucósido obtenida a partir de la doble extracción del olote.

Enzimas	Buffer	Concentración (mg/g)	
		Extracción 1) pH 4.5*3h 2) pH 3*24h	Extracción* 1) Metanol 2) Asistida c/ enzimas
Control	Acetatos	2.4325	ND**
Celluclast		3.5408	ND
NS-500010		3.1176	ND
NS-500012		3.2588	ND
NS-500013		3.8754	ND
Control	Citratos	2.7748	ND
Celluclast		3.4138	ND
NS-500010		3.5116	ND
NS-500012		3.4276	ND
NS-500013		3.9002	ND

*La primer extracción se realizó con 1) metanol acidificado y después 2) Extracción asistida c/ enzimas.** ND= No determinado

**Imagen 5.** Cromatograma obtenido para la muestra de olote con NS-50012, extracción con buffer de citratos, pH=3, 25°C y 2% de enzima.

Los resultados obtenidos con HPLC, muestran el perfil de antocianinas y cómo este varía de acuerdo a los tratamientos a los que fueron sometidos cada una de las muestras. Tanto para el olote como para el pericarpio se observa un incremento en la cianidina-3-glucósido para las condiciones que resultaron las mejores para la extracción asistida con enzimas, esto puede deberse a que para estos casos los extractos se encontraban a un pH adecuado y su coloración se

encontraba en un rojo intenso; la cianidina-3-glucósido por su estructura se ha encontrado que puede brindar estos tonos rojizos, mientras que la peonidina se ha encontrado en colores morados-violetas.

De acuerdo a lo reportado en estudios anteriores en este tipo de maíces se encuentran tres antocianinas principales, la primera en aparecer es la pelargonidina la cuál es posible observar en algunos cromatogramas obtenidos (Imagen 6) en este trabajo pero se observa su disminución y hasta su desaparición en algunos casos esto puede deberse a que es una de las antocianinas con menor estabilidad, debido al grado de metoxilación que posee.

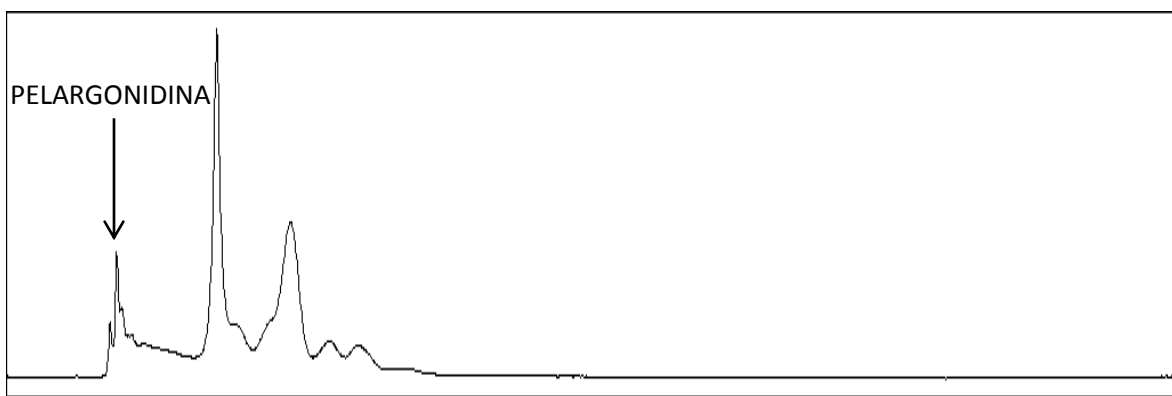


Imagen 6. Cromatograma obtenido para la muestra de olote extracción con buffer de citratos, pH=3, 25°C.

Las enzimas representan una opción si se desea obtener extractos enriquecidos en alguna de las antocianinas presentes en este tipo de maíz. Ya que si bien no se observa el incremento de la misma antocianina con los tratamientos, en todos los casos existe un incremento ya sea de cianidina o peonidina entre un 12- 50% comparado con el método convencional de metanol acidificado.

CONCLUSIONES

Para el caso del pericarpio las mejores condiciones para la extracción asistida por enzimas son los buffer de acetatos y citratos a un pH de 3, no existiendo diferencia significativa entre ellos; la temperatura de extracción de 25°C y una concentración de enzima de 2%(p/p).

Para la muestra de pericarpio el Depol 740L (feruloilesterasas) brinda el mejor resultado para antocianinas totales que fue de 7.5746 mg/g de muestra, aunque realizando el análisis de varianza nos indica que no existe diferencia significativa entre las enzimas o cocteles de enzimas utilizadas.

Las mejores condiciones para el caso del olote son el buffer de acetatos y citratos iniciando con un pH de 4.5 y ajustándolo a 3 después de 3 horas, con un 2%(p/p) y 25°C. El mejor pool de enzimas es el NS-50012 obteniendo una concentración de antocianinas totales de 7.2898 mg/g de muestra. Para esta muestra no se encontró diferencia significativa entre las enzimas utilizadas. En estos casos se obtiene un rendimiento del 50% más comparándolo con el método convencional de metanol acidificado.

Que el pH de 3 dé las concentraciones mayores de antocianinas es debido a que además de favorecer la extracción de las antocianinas, también favorece su estructura más estable de catión flavilio. Por lo que a pesar de que las enzimas se vean disminuidas en su actividad, este pH presenta los mejores resultados.

La cuantificación de fenoles totales expresada como ácido gálico (mg/g de muestra) las mayores concentraciones se obtienen con las mismas condiciones encontradas para las antocianinas totales.

Dentro de esta etapa también se realizó la extracción en dos partes, 1) la convencional con metanol acidificado y 2) extracción asistida por enzimas, con esto se observan concentraciones similares a las obtenidas con una sola extracción asistida con enzimas, con ello se obtiene que la extracción asistida por

enzimas resulta eficiente y con buenos rendimientos en comparación con los métodos convencionales.

Para el caso del análisis con la cromatografía de líquidos de alta resolución se obtiene que las muestras donde existe una concentración mayor de cianidina-3-glucósido son las tratadas con buffer de acetatos y citratos a un pH de 3, como en el caso de la cuantificación de antocianinas totales. En este caso se obtiene 3.9746 mg/g de muestra, para el tratamiento con el pool enzimas Depol 670L con el buffer de acetatos. Existe un incremento en la concentración de la cianidina del 60% en comparación con la obtenida con la muestra control.

En las muestras donde no se determinó la presencia de la cianidina-3-glucósido se observa una tendencia similar entre ellas, donde el incremento se presenta en la peonidina-3-glucósido que se identifico de acuerdo a su tiempo de retención reportado en la literatura al no contar con un estándar.

Con los resultados obtenidos se puede decir que la extracción asistida por enzimas ayuda a la liberación de las antocianinas que se encuentran en los tejidos de los granos y pericarpio de maíz brindando una alternativa para la obtención de colorantes naturales a partir de este cereal.

PERSPECTIVAS

Se deja abierta la posibilidad de utilizar este tipo de maíz o sus residuos, como el olote, para generar colorantes con usos en la industria alimenticia, ya que además de ser un colorante de origen natural se le han atribuido a las antocianinas propiedades que brindan beneficios para la salud.

Debido a esto se recomienda continuar con el estudio en la modificación de las moléculas de antocianinas, para incrementar su estabilidad, para que puedan ser utilizadas en alimentos con condiciones que normalmente resultarían adversas para su estabilidad.

ANEXO A

Curva de calibración de fenoles totales

Para calcular la concentración de fenoles totales se efectuó una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar en un intervalo de 50 a 500 mg/L.

El procedimiento para realizar la curva fue el siguiente: Se mezclaron 2 mL de la solución estándar con 3mL de ácido clorhídrico al 0.3% de esta mezcla se tomó un alícuota de 100µL que se mezcló con 2 mL de Na₂CO₃ al 2% por 2 minutos después de los cuales se adicionaron 100µL del reactivo Folin-Ciocalteu diluido con agua (1:1) y se dejaron reposar por 30 minutos. Se leyó su absorbancia por triplicado en el espectrofotómetro a una longitud de 750 nm.

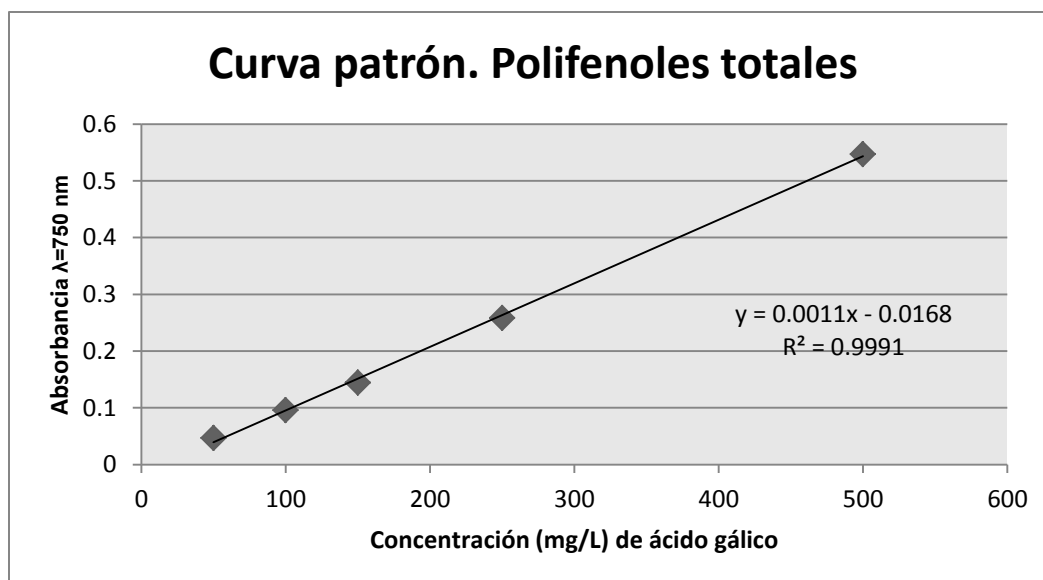


Figura 23. Curva patrón de fenoles totales

ANEXO B

Curva patrón cianidina-3-glucósido para HPLC

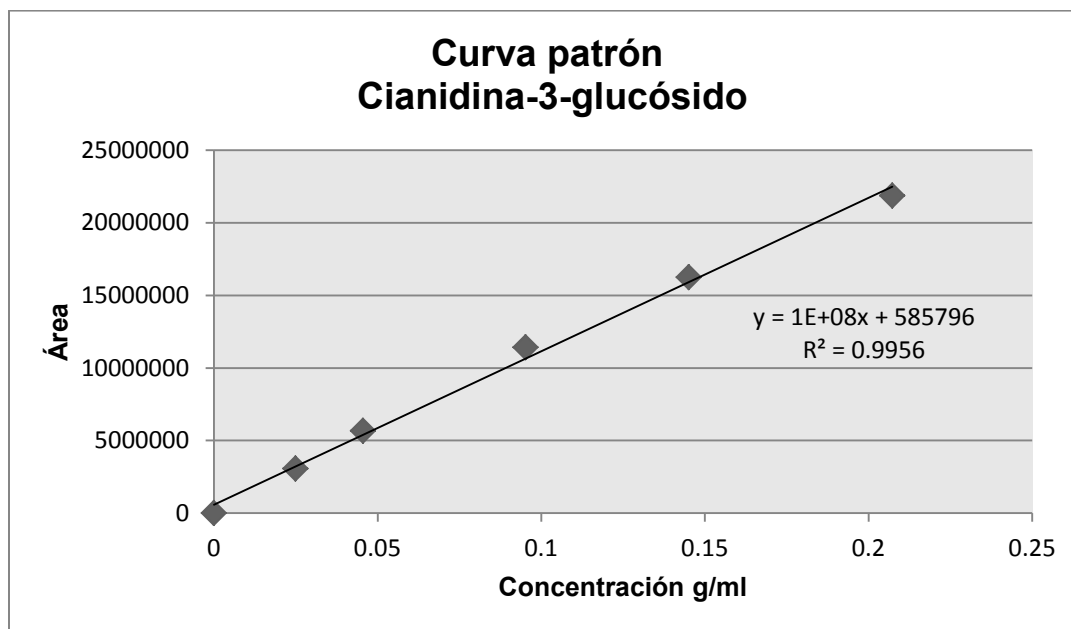


Figura 24. Curva patrón para cianidina-3-glucósido

BIBLIOGRAFÍA

- Anis Arnous, Anne S. Meyer. "Discriminated release of phenolic substances from red wine grape skins (Vitis." *Biochemical Engineering Journal*, 2010: 68-77.
- Aoki, H, N Kuze, and Y Kato. "Anthocyanins isolated from purple corn (Zea mays L.)." *San-Ei Gen F.F.I. Inc. The Japan Food Chemical Research Foundation*, n.d.: N° 199.
- Bechtold T Mussak, R. *Handbook of Natural Colorants*. U.K.: John wiley & sons, 2009.
- Buchert Johanna, Koponen Jani M, Marjaana Suutarinen, Mustranta Annikka,. "Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2005: 2548–2556.
- Chattopadhyay, P, C Sandipan, and K Sukanta. "Review Biotechnological potential of natural food grade biocolarnts." *Africa Journal of Biotechnology*, 2008: 2972-2885.
- Cuevas Montilla, Antezana , Winterhalter P. "Análisis y caracterización en diferentes variedades de maíz (Zea mays) boliviano ." *red alfa lagrotech comunidad europea*, 2008: 1-17.
- Delgado Vargas, F, and O Paredes-López. "Natural colorants for food and nutraceutical use." *CRC Press LLC*, 2003: 7-34,93-109,113-141,143-191, 221-2247.
- Dendy, D, A.V. Dobraszczyk, and J Borda. "Cereales y productos derivados." *Química y Tecnología*, 2001: 389,392-393.
- Escribano-Bailon, M.T., and Celestino Santos-Buelga. "Review Anthocyanins in cereal." *Journal Chromatography*, 2004: 129-141.

- Fossen, Torgils, Slimestad Rune, and Andersen Oyvind . "Anthocyanins from maize (*Zea mays*) and Reed Canarygrass (*Phalaris arundinacea*)." *Journal Agriculture Food Chemistry*, 2001: 2318-2321.
- Giusti, T.C.Wallace and M.M. "Determination of Color, Pigment, and Phenolic Stability in Yogurt Systems Colored with Nonacylated Anthocyanins from *Berberis boliviana* L. as Compared to Other Natural/Synthetic Colorants." *Food Chemistry*, 2008: 241-248.
- Goiffon, Jean-Paul, Pierre P. Mouly, and Emile M. Gaydou. "Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated." *Analytica Chimica Acta* 382, 1998: 39-50.
- Gorriti Gutierrez, Arilmi. "Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante de las corontas de maíz morado (*Zea mays*): Método de extracción." *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2009: 509-518.
- Gorriti Gutierrez, Arilmi. "Extraction of anthocyanins from purple corn cobs of *Zea mays* L." *Ciencia e Investigación* 2009, 2009: 64-74.
- Gutiérrez-Vite, L, and A. L. Pérez Morán. *Identificación y cuantificación de los colorantes presentes en tortillas azules*. México: Tesis Profesional, UNAM, 2008.
- Hosseney R., Carl. *Principios de Ciencia y Tecnología de los Cereales*. España: Acribia Zaragoza, 1996.
- Jing P, Giusti M. M. "Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays* L.) Color Extract." *Food Chemistry and Toxicology*, 2007: 363-368.
- Kulp Karel, Ponte Joseph. *Handbook of Cereal Science and Technology*. USA: Marcel Dekker, 2000.

- Lee Jungmin, Rennaker Christophe , Wrolstad Ronald E. "Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods." *Food Chemistry*, 2008: 782-786.
- López Martínez, Leticia X, Rosa M. Oliart-Ros , Gerardo Valerio-Alfaro, Chen-Hsein Lee, and Hugo S. García. "Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanin content of eighteen strains of Mexican maize." *Food Science and Technology*, 2009: 1187-1192.
- López Ramírez Rosalba, Quiñones Winston, and Echeverría Fernando. "Perfil cromatográfico de las antocianinas presentes en algunos frutos colombianos." *Scientia et Technica*, 2000: N° 33.
- Muñoz O, Sepulveda M. ,Schwartz M. "Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grape skin from Chilean wine." *Food Chemistry*, 2004: 487-490.
- Organización de las Naciones Unidas, Agricultura y Alimentación. "El maíz en la nutrición humana." *Colectión FAO N° 25*, 1993: Código FAO: 86AGRIS:S01.
- Passos Cláudia P., Sule Yilmaz ,Silva Carlos M , Coimbra Manuel A. "Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail." *Food Chemistry*, 2008: 48-53.
- Primo, E. *Química Orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria*. Reverté, 2007.
- Prodanov M.P., Dominguez J.A., Blazquez I., Salinas M.R, Alonso G.L. "Some aspects of the quantitative/qualitative assessment of commercial anthocyanin-rich extracts." *Food Chemistry*, 2009: 585-596.
- Puri, Munish, Deepika Sharma, and Colin Barrow. "Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants." *Cell press*, 2011: 1-8.

- Rein, Maarit. "Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins." *tesis académica Facultad de Agricultura y Silvicultura d ela Universidad de Helsinki. Departamento de Química Aplicada*, 2005.
- Ruiz Torres Norma, et. al. "Determinación de compuestos fenolicos y su actividad Antioxidante en granos de maíz." *Revista Fitotecnica Mexicana*, 2008: 31-34.
- Salinas Moreno, et. al. "Acido eleagic y perfil de antocianinas en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* L) con diferente grado de maduración." *Redalyc*, 2009: 97-101.
- Salinas Moreno, Yolanda, David Rubio Hernández, and Antonio Díaz Velazquez. "Extracción y uso de pigmentos del grano de maíz (*Zea mays* L) como colorantes de yogur." *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 2005: 293-298.
- Serna-Saldívar, O. *Química, almacenamiento e industrialización de los cereales*. México: AGT Editor S.A., 1996.
- Sowbhagya, H.B., and V.N. Chitra. "Enzyme-Assisted Extraction of Flavorings and Colorants from Plant Materials." *Food Science and Nutrition*, 2011: 146-151.
- Thorsten Maier, Anne Goppert, Dietmar R. Kammerer. "Optimization of a process for enzyme-assisted pigment extraction from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace." *Food Technologic*, 2008: 267-275.
- Torskangerpoll Kjell, Andersen Øyvind M. "Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values." *Food Chemistry*, 2005: 427-440.
- Verbeyst Lise, Oey Indrawati, Van der Plancken lese, Hendrickx Marc, Van Loey Ann. "Kinetic study on the thermal and pressure degradation of anthocyanins in strawberries." *Food Chemistry*, 2010: 269-274.