



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**APLICACIÓN DE TECNOLOGÍAS EMERGENTES PARA
EXTRACCIÓN ÓPTIMA DE ANTOCIANINAS DEL
TOTOMOXTLE Y OLOTE DE MAÍZ CRIOLLO MORADO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

MARÍA FERNANDA FERNÁNDEZ AULIS



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: Arturo Navarro Ocaña

VOCAL: José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

SECRETARIO: Amelia María de Guadalupe Farrés González Saravia

1er. SUPLENTE: Argelia Sánchez Chinchillas

2° SUPLENTE: Hilda Elizabeth Calderón Villagómez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**L-321 DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA. CONJUNTO E.
FACULTAD DE QUÍMICA. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

ASESOR DEL TEMA: ARTURO NAVARRO OCAÑA

SUPERVISOR TÉCNICO: HILDA ELIZABETH CALDERÓN VILLAGÓMEZ

SUSTENTANTE: MARÍA FERNANDA FERNÁNDEZ AULIS

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química de la UNAM por brindarme la oportunidad de estudiar en sus aulas y brindarme siempre todo el material y equipo necesario para lograr alcanzar mi sueño de ser Química de Alimentos.

Al Dr. Arturo Navarro por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto y siempre estar al pendiente de su avance, por compartir conmigo su conocimiento y ser una guía para mi desarrollo en la investigación, por impulsarme siempre a mejorar, y por brindarme siempre su apoyo y confianza.

A la Dr. Hilda Calderón por sus valiosas recomendaciones y observaciones durante el desarrollo experimental y por su tiempo dedicado a mi aprendizaje en el laboratorio.

A la Dra. Amelia Farrés y al Dr. Guillermo Aguilar por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y a sus apreciados comentarios y recomendaciones, las cuales hicieron posible la mejora de este trabajo.

Al financiamiento brindado por el proyecto PAPIIT-IN223611.

DEDICATORIAS

A Dios por cuidar siempre de mí protegiéndome de las malas influencias y por darme el regalo más grande en la vida, por ponerme en mi camino a personas especiales las cuales me han ayudado a llegar a ser lo que soy ahora.

A ti papá por el gran sacrificio que has hecho a lo largo de mi vida para que siempre tuviera lo mejor, por enseñarme el valor del trabajo y siempre hacerlo con responsabilidad, humildad y honradez, por que siempre me apoyaste y no dudaste de mi capacidad para lograr alcanzar mis sueños.

A ti mamá por tu gran amor incondicional, por ser mi amiga y siempre estar ahí cuando más lo necesito, por tu gran apoyo a lo largo de todo este camino, por impulsarme siempre a ir por más, por todos los sabios consejos que me has dado, por ser un ejemplo a seguir, y por mil cosas más.

A ti Ricardo por ser una parte importante en mi vida, por acompañarme y guiarme en todo momento, por tus grandes consejos más allá de lo académico, por cuidar siempre de mi y regañarme cuando era necesario, por decirme siempre la verdad, por todo tu cariño , en fin, por muchas cosas más.

A todos mis amigos por su apoyo, y por darme ánimos a lo largo de esta última etapa, por los grandes momentos que compartimos a lo largo de toda la carrera, por su brindarme su valiosa amistad, porque estoy segura que el regalo más grande que hay es la verdadera amistad, a todos los quiero mucho. A Surya por sus grandes consejos y por ser una gran amiga, a Moni, Cris, Iliana, Denise, Ángel por todos esos momentos de diversión y risa que pasamos. A Erick por ser un verdadero amigo, a Óscar que por ser tan ñoño me ayudo tantas veces, a Belén por ser una gran persona, a Jess que a pesar de todo estos años sigues siendo un verdadero apoyo, por tus consejos dados en todas esas salidas y mil cosas más, a Edelí por sus grandes ocurrencias y hacerme la estancia en el laboratorio más agradable y por demostrarme su amistad en tan corto tiempo, en fin a mil personas más que no podría mencionar pero que saben que los aprecio mucho, a todos los quiero y aprecio mucho.

A todos mis compañeros de laboratorio, a Naty que me compartió su conocimiento, a Jazmín por sus consejos, a Anabel por sus grandes consejos y atinados comentarios, a Ruth, Pedro, Johny, Andy, a las dos Lauritas, Lilián y Rodrigo por hacer mi estancia en el laboratorio más amena.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. MARCO TEÓRICO	4
3.1. <i>Maíz</i>	4
3.1.1. <i>Estructura y composición</i>	5
3.1.1.1. <i>Composición de la planta</i>	6
3.1.1.2. <i>Composición del grano</i>	8
3.1.2. <i>Compuestos Bioactivos del Maíz</i>	9
3.1.2.1. <i>Ácidos fenólicos</i>	9
3.1.2.2. <i>Carotenoides</i>	10
3.1.2.3. <i>Lignanos</i>	11
3.1.2.4. <i>Esteroles</i>	11
3.1.2.5. <i>Flavonoides</i>	12
3.1.3. <i>Razas de maíz</i>	13
3.1.4. <i>Producción y Rendimientos</i>	14
3.2. <i>Colorantes Naturales</i>	15
3.2.1. <i>Estabilizantes</i>	16
3.3. <i>Generalidades de Antocianinas</i>	18
3.4. <i>Métodos de Extracción</i>	20
3.4.1. <i>Métodos clásicos de extracción</i>	20
3.4.1.1. <i>Maceración</i>	20
3.4.2. <i>Métodos modernos de extracción</i>	21
3.4.2.1. <i>Sonicación</i>	21
3.4.2.3. <i>Extracción asistida por enzimas</i>	23
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS.....	26
5.1. <i>Objetivo General</i>	26
5.2. <i>Objetivo Particular</i>	26
6. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL.....	27
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34

7.1.	<i>Datos de la muestra</i>	35
7.2.	<i>Determinación de Antocianinas Totales</i>	35
7.3.	<i>Determinación de Fenoles totales</i>	36
7.4.	<i>Cuantificación por HPLC</i>	37
7.5.	<i>Evaluación instrumental de color</i>	37
7.6.	<i>Análisis Estadístico</i>	38
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
8.1.	<i>Preparación de la muestra</i>	39
8.2.	<i>Condiciones óptimas de extracción.</i>	39
8.2.1.	<i>Disolvente</i>	40
8.2.2.	<i>Tiempo de extracción</i>	42
8.2.3.	<i>Relación soluto:disolvente S/D y número de extracciones</i>	43
8.2.4.	<i>Ácidos</i>	47
8.3.	<i>Métodos de Extracción.</i>	49
8.3.1.	<i>Maceración</i>	49
8.3.2.	<i>Sonicación</i>	51
8.3.3.	<i>Microondas</i>	54
8.3.4.	<i>Enzimático</i>	56
8.3.4.1.	<i>Enzima a utilizar</i>	56
8.3.4.2.	<i>Concentración</i>	58
8.3.4.3.	<i>pH</i>	59
8.3.4.4.	<i>Temperatura</i>	60
8.3.4.5.	<i>Tiempo de extracción</i>	60
8.3.5.	<i>Comparación de métodos no convencionales</i>	62
8.3.6.	<i>Identificación en HPLC</i>	65
8.4.	<i>Evaluación de Estabilidad de Antocianinas del Totomoxtle</i>	67
8.4.1.	<i>Estabilidad frente a diferentes ácidos</i>	67
8.4.2.	<i>Evaluación de color frente a diferentes vehículos</i>	69
9.	CONCLUSIONES	72
10.	RECOMENDACIONES	74
11.	REFERENCIAS	75

1. RESUMEN

Los compuestos fenólicos son compuestos orgánicos que contienen por lo menos un grupo fenol. Existe una gran variedad de estos compuestos por lo cual se clasifican en 4 grupos de manera general: ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos y flavonoides. A su vez los flavonoides se clasifican en siete grupos: flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles, isoflavonas, flavanoles y antocianidinas. Se encuentran distribuidos en todas las plantas como metabolitos secundarios los cuales tienen funciones fisiológicas importantes, como la defensa en situaciones de estrés, contra insectos, como repelente. El consumo frecuente de frutas y vegetales frescos se asocia con una menor incidencia de cáncer, son también antioxidantes, anticoagulantes, antimicrobianos, inmunoestimulantes, reguladores de la presión arterial y la glucemia. Las antocianinas además de presentar una actividad biológica presentan una coloración que va rojo hasta azul, pasando por morado, lila, rosa, magenta, etc, por lo que estos compuestos son los responsables del color de muchas frutas, flores y cereales.

El maíz criollo morado presenta una coloración púrpura debida a las antocianinas, que está distribuida en toda la planta desde el grano hasta las hojas que cubren el fruto, denominadas totomoxtle.

El objetivo general es obtener las condiciones óptimas para extraer las antocianinas presentes en el totomoxtle y el olote del maíz criollo mediante tecnologías de extracción limpias, así como evaluar la estabilidad frente a diferentes ácidos y vehículos.

La extracción de antocianinas se hizo por medio de tecnologías de extracción ahorradoras de energía y reactivos compatibles con la biósfera como son: sonicación, microondas y enzimático, respectivamente. Para cada uno de estos procesos de extracción se optimizaron las variables más representativas con la finalidad de obtener los mejores rendimientos.

Para lograr el objetivo, el proyecto se divide en 3 etapas.

- ✿ La primera etapa se enfoca en optimizar las condiciones de extracción (tiempo, disolvente, ácido y relación soluto:disolvente) con el método de maceración con agitación para el totomoxtle de maíz criollo morado
- ✿ En la segunda etapa, una vez obtenidas las condiciones óptimas de extracción para: disolvente, ácido orgánico y la relación soluto:disolvente, se estudian las variables más representativas para cada uno de los métodos que se proponen:
 - Sonicación: Tiempo y Potencia (70W y 100W) → Para el totomoxtle y olote
 - Microondas: Tiempo (30, 60, 180 segundos) → Para el totomoxtle y olote
 - Enzimático: Tiempo, Enzimas, Concentración de enzima (10,15 y 20%), Temperatura (30,40 y 50°C) y pH (3 Y 5) → El estudio se realiza con el residuo obtenido de la extracción del totomoxtle.
- ✿ En la tercera etapa se lleva a cabo la evaluación de la estabilidad de las antocianinas frente a diferentes ácidos (tartárico, láctico, ferúlico y cítrico) y en diferentes vehículos (inulina, dextrina y harina de amaranto) en presentación sólida y líquida, las antocianinas que se usaron en esta etapa son las provenientes del totomoxtle de maíz morado.

2. INTRODUCCIÓN

El maíz es uno de los cereales más importantes en el mundo, en especial para México, ya que es la base de la alimentación, además de ser el centro de origen, lo que representa parte de nuestra cultura y economía.

En México se cuenta con una gran diversidad de maíces distribuidos a lo largo de la república mexicana, los cuales están adaptados a las condiciones climáticas y tecnológicas de los productores. Esta gran diversidad permite tener maíces que poseen características diferentes dependiendo de la raza y variedad. Entre éstos se encuentran los maíces criollos coloridos, que presentan tonalidades desde blanco, amarillo, rojo, morado, púrpura, azul hasta negro, cada uno de los cuales presenta diferentes características las cuales deben ser estudiadas y determinar la mejor aplicación tecnológica a la cual se destine cada variedad de maíz.



Figura 1. Variedad de maíces criollos coloridos

Los colores rojos, morados, azules y negros en los maíces son causados por su contenido de antocianinas, las cuales están distribuidas a lo largo de toda la planta. Estos colorantes se pueden extraer y generar un colorante de origen natural, el cual no presenta ningún inconveniente en su consumo, a diferencia de los colorantes artificiales.

Se ha demostrado que las antocianinas, además de brindar color, presentan un beneficio en la salud humana, ya que actúan como antioxidantes previniendo enfermedades como el cáncer, además de tener efecto anti-inflamatorio, anti-teratogénico, antiviral, efecto benéfico en el sistema inmune y vascular. (Florian y Reinhold, 2004).

El cultivo de maíz se caracteriza por que es posible generar una gran cantidad de productos finales como tortillas, forraje para animales, almidones, glucosa, aceites, botanas, etanol, atoles, tamales, etcétera. (INE, 2008)

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Maíz

El maíz (*Zea mays* L.) pertenece a la familia de las gramíneas. Este género incluye cinco especies que se sabe son originarias de México y Centroamérica: (1) *Zea mays* L. ssp *Huehuetenangensis*, (2) *Zea Mays* L. ssp *Mexicana*, (3) *Zea mays* L. ssp. *Parviglumis* (*teocintle*) y (4) *Zea mays* L. ssp. *Mays* a la cual pertenece el maíz y es la única especie cultivada de este género. La planta de maíz es de porte robusto de fácil desarrollo y de producción anual.

Tabla 1. Taxonomía del maíz (Reyes, 1990)

Categoría	Maíz	Característica
Reino	Vegetal	Planta anual
División	Tracheophyta	Sistema vascular
Sub-división	Pterapside	Producción de flores
Clase	Angiosperma	Semilla cubierta
Sub-Clase	Monocotiledóneae	Cotiledón único
Orden	Graminales	Tallos con nudos prominentes
Familia	Graminae o Poaceae	Grano-Cereal
Tribu	Maydeae	Flores unisexuales
Género	<i>Zea</i>	Único
Especie	<i>Mays</i> L. <i>Perennis</i>	Maíz común Teocintle perenne
Raza	Más de 300 razas. 41-65 en México	

Los primeros cultivos de maíz aparecieron en México; se encontraron 19 granos de polen fosilizados, cuya edad se estimó entre los 60 y 80 mil años, además se encontraron plantas o partes de la planta de maíz en esculturas impresiones, códices y cerámicas prehistóricas que indican el inicio de la domesticación del maíz hacer 5 o 6 mil años dentro del territorio mexicano, específicamente en el valle de Tehuacán, Puebla y el norte del estado de Oaxaca. (Reyes, 1990). Dado que México es el centro de origen del maíz se

cuenta con una gran diversidad desde la forma, tamaño, color y composición. Esta variabilidad es debida a la amplia plasticidad de adaptación que tiene, ya que puede cosecharse a lo largo de todo el territorio mexicano desde zonas tropicales a zonas templadas, en diferente altitud, condiciones del suelo, etc. (Rupusudan *et al*, 2001).

Los usos del maíz han sido muy amplios porque dependiendo de la variedad, parte de la planta y estado de maduración presentan características que dan propiedades tecnológicas diferentes. Por ejemplo, el grano es usado industrialmente para la elaboración de tortillas, tostadas, atole, tamales, totopos, pinole, pozole, pozol, etc. Así cada parte de la planta es usada para propósitos diferentes, las hojas que cubren el fruto del maíz, también llamadas totomoxtle, o las hojas verdes son usadas para envolver tamales; el olote se usa como alimento para animales, el tallo se usa para obtener combustible e incluso los hongos de la mazorca tierna se usan como alimento (Huitlacoche). En México se han documentado más de 600 recetas de alimentos preparados con base en el maíz, además de su uso en bebidas y como medicamento.

3.1.1. Estructura y composición

El maíz es una planta anual que se reproduce por polinización cruzada de la flor femenina (elote) y la masculina (espiguilla) (Benitez, 2006). Su estructura básicamente esta formada por:

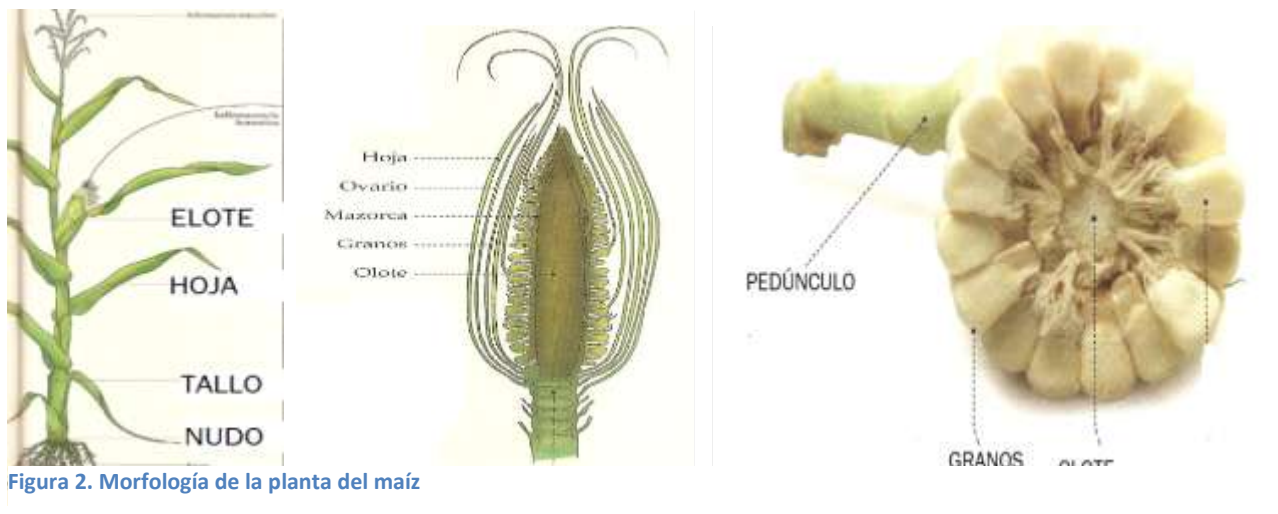


Figura 2. Morfología de la planta del maíz

Raíz. Las cuales constan de dos o tres sistemas de raíces, según la especie. Sus raíces primarias son robustas y cuenta con raíces adventicias (que no se generan del embrión)

Tallo. El tallo se le conoce como caña y está formado por nudos y entrenudos; estos son cilíndricos y pueden ser huecos. Puede alcanzar gran altura dependiendo de la variedad, desde 0.30 m hasta 5.5.m (Reyes, 1990).

Hojas. Normalmente constan de vaina, lígula y lámina. La vaina tiene forma de tubo o cartucho, nace en el nudo y cubre el entrenudo. La lígula es una membrana que se halla en

la parte superior interna de la vaina. La lámina es paralelinervada (con venas casi paralelas entre sí), en forma de cinta o lanceolada de tamaño variable (Reyes, 1990)

Inflorescencia. Es compuesta, siendo la inflorescencia elemental la espiguilla y la total espiga, las cuales pueden ser laxas o densas. La espiguilla está protegida por dos brácteas llamadas glumas (Reyes, 1990).

Mazorca o elote. Es la estructura donde se desarrolla el grano, en un número variable de hileras (Benitez, 2006) cuyo número depende de la raza y está encerrada en varias vainas de hojas llamadas totomoxtle. Está formado por pedúnculo, olote, granos y totomoxtle.

El porcentaje en peso correspondiente al tallo, elote y hoja es variable dependiendo de la variedad y el contenido de humedad de cada órgano, pero en promedio se han obtenido los valores presentados en la tabla 2 los cuales son obtenidos de maíces criollos, mientras que los maíces híbridos presentan un menor porcentaje en su producción de forraje (Elizondo y Boshini, 2002)

Tabla 2. Contenido de materia seca en los diferentes componentes de la planta (Elizondo y Boshini, 2002)

Órgano	Contenido de materia seca (%)
Tallo	10
Elote	11
Hoja	15

Cada una de las partes de la planta presentan una composición química diferente por lo que dependiendo de la aplicación que se quiera dar, además de la parte de la planta existen otros factores que determinan la composición que son: la raza, variedad, tecnología de cultivo y clima.

3.1.1.1. *Composición de la planta*

Los rendimientos en la producción de forraje verde pueden variar dependiendo de la variedad de maíz, fertilidad del suelo, edad del corte y la densidad de siembra entre otros factores. Sin embargo se han reportado que en la producción de maíz criollo se obtienen rendimientos de 10.2 toneladas de materia seca por hectárea con una densidad de siembra de 96000 plantas/ha, este rendimiento puede ser mayor si se mejoran las condiciones obteniéndose hasta un 15.2 toneladas de materia seca/ha. (Elizondo y Boshini, 2002).

La composición en general del tallo, hojas y mazorca está alrededor del 40-60% de carbohidratos de los cuales el tallo presenta una mayor contenido de fibra es el tallo seguido de las hojas, mazorca y grano.

Tabla 3. Composición general de las diferentes partes de la planta de maíz.

	% en la planta	Proteína	Grasa	Cenizas	Carbohidratos	Fibra
Tallo	35.8-47.2	5.1-6.1	0.12-0.89	5.5-8.9	39.0-46.2	33.3-38.3
Hoja	21.5-28.4	10.9-11.9	0.87-1.5	11-12.7	45.2-52.4	25.5-31.3
Mazorca	25.7-37.8	8.5-10.3	0.66-1.3	1.9-3.4	56.1-61.5	16-20.4
Grano seco	-	8.7-13.8	3.22-5.21	1.3-2-6	65.5-71.7	2.2-2.9

Dentro de la composición de esta fibra, se encuentra la hemicelulosa, su estructura generalizada está compuesta principalmente por unidades de β -1,4-xilopiranosil y ramificaciones de α -L-arabinofuranosil, unidas a la cadena principal por enlaces 1-2 o 1-4, existen también cadenas laterales compuestas por arabinoxilanos β -1,3, β -1,4 glucanos y ácido D-glucurónico o algunos otros oligosacáridos

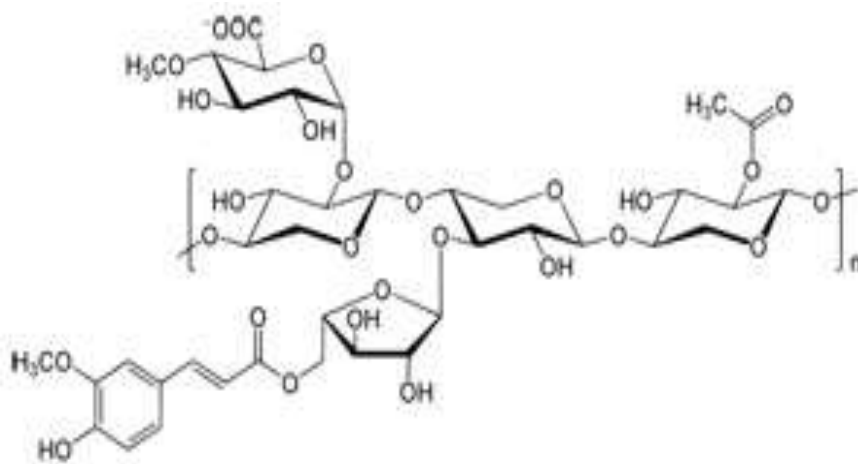


Figura 4. Estructura de los arabinoxilanos presentes en maíz



Figura 3. Fotografía del totomoxtle del maíz rojo

Específicamente en el olote se ha determinado que presenta un 36% de celulosa, 19-23% de hemicelulosa, 17-26% lignina, y de glucosa 4%. (Amor *et al*, 2008).

3.1.1.2. Composición del grano

De manera muy general se sabe que la composición del grano de maíz comprende del 64 al 78 % del grano es almidón mientras que solo del 1-3% son carbohidratos.

Tabla 4. Composición química del grano de maíz en base seca (b.s.)

Componente	Porcentaje
Almidón b.s.	64-78
Grasa b.s.	3.1-5.7
Proteína b.s.	8-14
Cenizas b.s.	1.1-3.9
Azúcares b.s.	1-3
Fibra b.s.	1.8-3.5
Humedad	7-23

El grano está formado de 3 partes: el endospermo, pericarpio y germen, cada una de las cuales está formada por capas, como se muestra en la figura 5. Cada una con una composición química diferente.

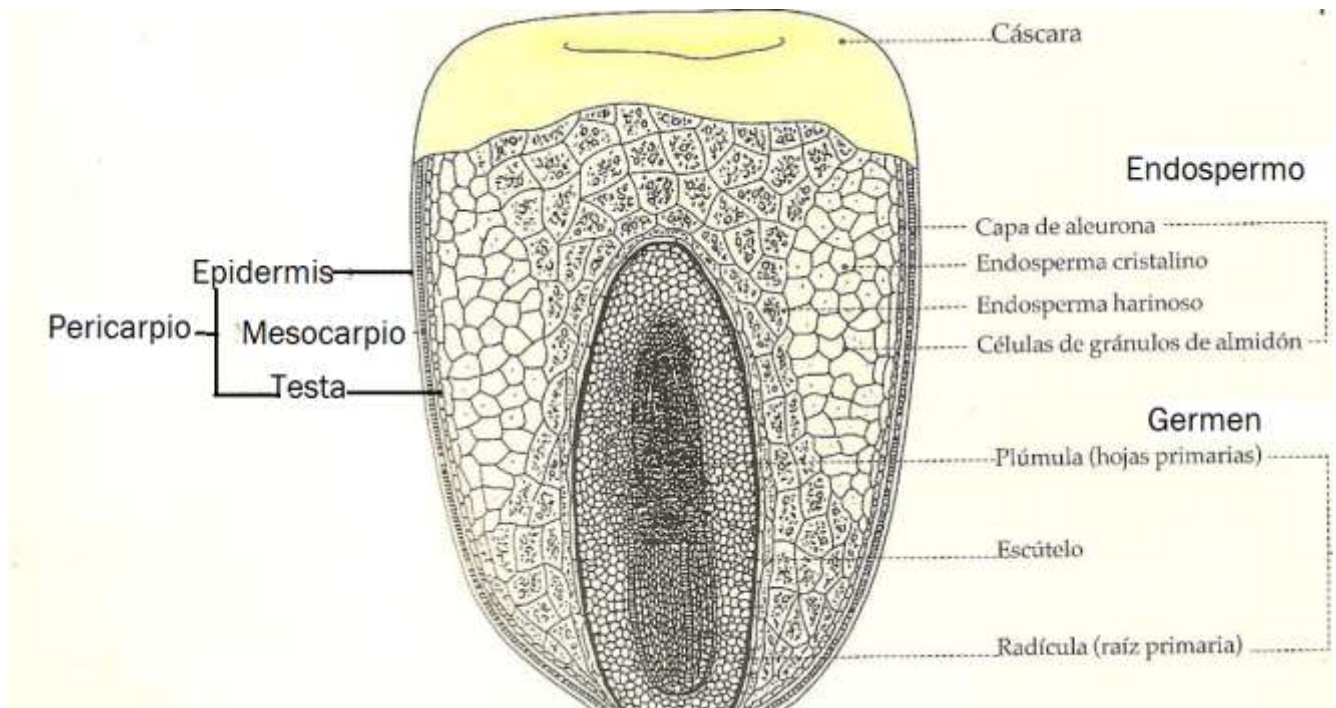


Figura 5. Estructura del grano de maíz (Benitez, 2006)

En los tipos de maíces comunes, el endospermo comprende cerca del 84% del peso seco del grano, el embrión abarca el 10% y el pericarpio y el escutelo componen el restante 6%.

El endospermo del grano de maíz es la zona más importante de almacenamiento de los carbohidratos y de las proteínas sintetizadas. Está cubierto por una capa de aleurona que tiene una naturaleza proteica. En esta parte se encuentra la mayor cantidad de almidón y contiene proteínas (albúminas, globulina, prolamina o zeína y glutelinas) y en cantidades muy pequeñas grasas, cenizas y azúcares.

El pericarpio es la cubierta del fruto y se conoce como testa, ollejo o cáscara, y está conformado por 3 capas, la epidermis, mesocarpio y testa. Contiene almidón, grasa, proteína, cenizas, azúcares y fibra (carbohidratos como celulosa y hemicelulosa)

El germen está cubierto por una capa llamada escutelo, y contiene la mayor cantidad de grasa del grano.

3.1.2. Compuestos Bioactivos del Maíz

Los alimentos, además de aportar nutrientes, contienen una serie de sustancias no nutritivas que intervienen en el metabolismo secundario de los vegetales como los pigmentos, sustancias aromáticas, reguladores de crecimiento, antioxidantes, entre otras. No son considerados esenciales para la salud humana, pero pueden tener un impacto significativo en la misma. La distribución de compuestos fenólicos en tejidos y células de vegetales varía dependiendo del material estudiado. En maíz se le ha encontrado principalmente en el pericarpio, aleurona, endospermo y embrión. (Ruiz *et al*, 2008)

3.1.2.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son derivados de los ácidos benzoico y cinámico y están presentes en todos los cereales. En el maíz los ácidos hidroxibenzoicos que se encuentran son: el ácido protocatecuico, p-hidroxibenzoico, vanílico y siríngico, y los ácidos hidroxicinámicos son: cafeíco, ferúlico, y p-cumárico. Estos dos últimos son los más abundantes. Son compuestos de la pared celular que se encuentran esterificados, aunque también se pueden encontrar de forma libre, localizados en la capa exterior del pericarpio y son extraídos usando solventes orgánicos (Dykes y Rooney, 2007).

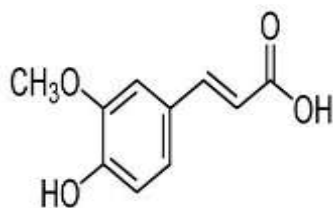


Figura 6. Estructura del ácido ferúlico

El ácido ferúlico, ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propanoico, es extremadamente abundante en la naturaleza, en el maíz se encuentra 1g/kg. Se puede aislar del pericarpio obtenido en los procesos de molienda húmeda, con un rendimiento del 2%. En plantas el ácido ferúlico proporciona rigidez a la pared celular entrecruzando cadenas de pentosanos, arabinosilanos y hemicelulosa. Participa en la regulación del crecimiento (Gaméz y Sánchez, 2006). La actividad biológica que presenta el ácido ferúlico es un buen antioxidante y anticancerígeno.

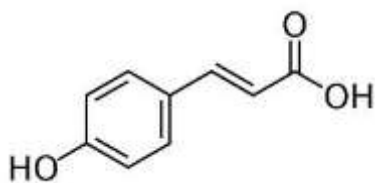


Figura 7. Estructura del ácido p-cumárico

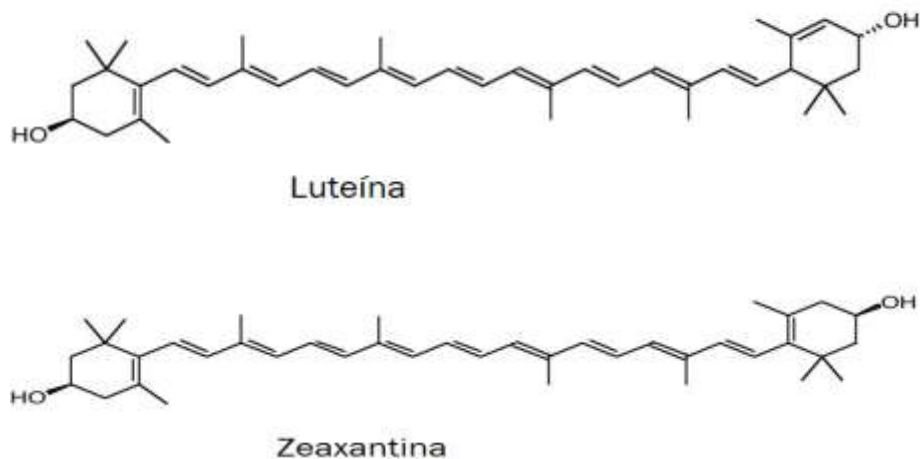
El ácido cumárico, ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propanoico, existen 3 isómeros, *o*-cumárico, *m*-cumárico y *p*-cumárico, este último es el encontrado en maíz, siendo su principal función la de proporcionar soporte y rigidez a la planta (Olvera, 2011). Tiene propiedades antioxidantes y se le atribuyen efectos gastroprotectores, ya que reducen la formación de carcinógenos

3.1.2.2. Carotenoides

El maíz contiene carotenoides, que son pigmentos naturales solubles en disolventes orgánicos. Su estructura química consta de un esqueleto de 40 carbonos formado por unidades de isopreno. Esta cadena puede tener terminaciones cíclicas en las que puede haber grupos funcionales que incluyen oxígeno.

Los carotenoides hidrocarbonados se conocen como carotenos, en tanto que los derivados oxigenados se denominan xantofilas. En ambos casos, la presencia de dobles enlaces alternados en la cadena de isoprenos les permite absorber excesos de energía de otras moléculas, por lo cual poseen propiedades antioxidantes. Por estas propiedades, se ha recomendado el consumo de luteína y zeaxantina, que son las xantofilas presentes en el grano de maíz. El contenido de carotenoides en el grano de maíz es influenciado por el genotipo y puede variar de 0.45 a 33.11 mg/kg (Salinas, 2008).

La luteína y zeaxantina son pigmentos de color amarillo que, a diferencia del beta caroteno y el alfa caroteno, no son precursores de la vitamina A ya que no se convierten en retinol. El papel fundamental de estas sustancias es evitar la formación de radicales libres, y de moléculas oxidativas que son las causantes de los daños en las membranas de las células de los tejidos oculares.



3.1.2.3. Lignan

Los fitoestrógenos son metabolitos que pueden tener acciones similares a los estrógenos en los humano. Los principales fitoestrógenos son los isoflavones y lignanos. Los lignanos ingeridos pueden ser biotransformados por las bacterias del tracto intestinal y posteriormente absorbidos. Estos compuestos imitan algunos efectos de los estrógenos por lo que se ha demostrado tener un efecto quimioprotector principalmente en el cáncer de mama y próstata (Boluda *et al*, 2006).

3.1.2.4. Esteroles

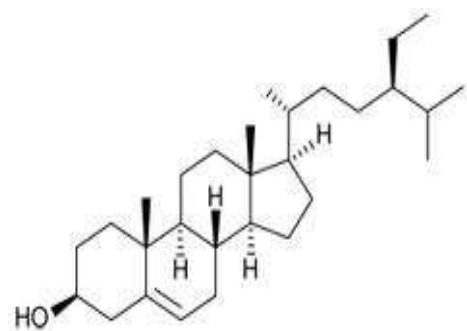


Figura 8 Estructura del Beta-sitosterol

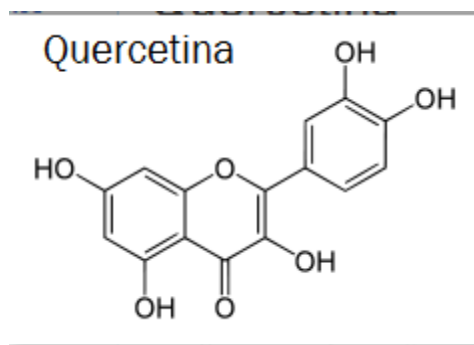
Los esteroides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se pueden encontrar esterificados o de forma libre. Todos los esteroides contienen un núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno y presentan un grupo hidroxilo en el carbono 3. La mayoría de esteroides naturales poseen una cadena lateral de 8 a 10 átomos de

carbono y un enlace doble en el C-5. En el maíz se encuentra el beta-sitosterol, el cual presenta una estructura similar al colesterol, sin embargo, presenta efectos diferentes ya que reduce la circulación del colesterol en el torrente sanguíneo por la inhibición de su absorción en el intestino, además presenta propiedades antioxidantes. En este sentido, esta sustancia se ha demostrado que estimula la producción de ciertas enzimas capaces de proteger a las células del daño oxidativo, debido a los radicales libres. Además se han estudiado propiedades anticancerígenas, específicamente cáncer de colon, próstata y cáncer de mama, ya que este beta-sitosterol favorece la apoptosis de las células cancerígenas, dejando intactas a las células sanas.

3.1.2.5. Flavonoides

El maíz contiene diferentes tipos de flavonoides dentro de los que se encuentran las antocianinas así como derivados de la quercetina y hesperidina de los que contienen alrededor de 42 mg/g (Valdez, et. al. 2010) y de antocianinas se han reportado concentraciones de 16.40 mg/ g en peso húmedo (Jing, 2006), mayor a las encontradas en otras fuentes como las moras (20-1500mg/100g B.H.), rábanos (11-60 mg/100g B.H.), uvas (30-750 mg/100g B.H.), col morada (69-94 mg/100g B.H.) (Bridle y Timberlake, 1995), las cuales son las fuentes actuales de obtención de antocianinas.

La quercetina es un flavonoide ampliamente distribuido en la naturaleza el cual presenta actividad antioxidante, impide la oxidación del colesterol LDL, además de inhibir daños producidos por los radicales libres, tener acción antiinflamatoria y un efecto protector hacia los riñones y el sistema urinario en general.



Las antocianinas encontradas en el grano y hojas de maíz se derivan de cianidina y pelargonidina (Straus, 1959) y se encuentran de manera simples y aciladas. En las simples, el único azúcar reportado es la glucosa, las antocianinas simples reportadas para maíz son cianidina 3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido y peonidina 3-glucósido (Styles y Ceska,

1972). La primera es común en los maíces de grano morado y las dos restantes en maíces de grano rojo.

El interés por las antocianinas se ha intensificado recientemente debió a sus propiedades benéficas. Durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo las antocianinas permanecen intactas y ejercen efectos terapéuticos conocidos que incluyen la reducción de enfermedades coronarias, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos tales como el control de lípidos, secreción de insulina y efecto vasoprotector; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo, estos efectos terapéuticos están relacionados con su actividad antioxidante (Aguilera *et al*, 2011). Estudios han demostrado que son efectivas en atrapar especies reactivas del oxígeno, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas. En cuanto a la actividad anticancerígena, Se han reportado la supresión de células cancerígenas provenientes del colon humano y de células cancerígenas gástricas al suministrar fracciones de antocianinas, además demuestran que los arándanos inhiben las etapas de iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis (Kamei *et al*, 1998).

3.1.3. Razas de maíz

En México se pueden encontrar una gran variedad de maíces, ya sea en el color, tamaño, composición y forma, ya que han sido cultivados bajo condiciones diferentes, cada una de estas variedades pertenece a un territorio específico, el cual presenta un único ambiente climatológico al cual el maíz se ha adaptado y ha sido perpetuado por diferentes culturas. Se han estimado en 2 mil variedades aproximadamente, las cuales se han agrupado en razas. Una raza representa a un grupo de individuos relacionados con suficientes características en común como para permitir su reconocimiento como grupo, teniendo un alto número de genes en común (Ripusudan *et al*, 2001).

Actualmente se ha progresado en la clasificación del gran número de razas de maíz. Como resultado, se han agrupado los materiales de México en tres grupos bien definidos desde el punto de vista morfológico (Paredes *et al*, 2006).

Tabla 5. Clasificación de las variedades de maíz (Ortega, 2007)

	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
Condiciones de Cultivo	Partes altas del centro y norte de México	Zonas altas Zonas de altura media Cultivo temporal Costas semiáridas con cultivo de riego	Zonas de altura media y altas del sur de México
Características	Forma cónica Mazorcas largas y delgadas	Mazorcas de 8 hileras Granos puntiagudos.	
Razas	Chapalote Reventador Tabloncillo	Cónico Cónico Norteño Chalqueño Arrocillo Amarillo Palomero Toluqueño	Jala Olotón Zapalote Chico Bolita Nel Tel

Las razas de maíz cuyas variedades son ampliamente comerciales son: Vandeño, Tuxpeño (algunas veces morado), Tabloncillo, Chalqueño (blanco o morado) y Celaya. En diferentes regiones del mundo se han clasificado los maíces, disponiéndose de más de 300 razas de las cuales 59 han sido confirmadas de origen mexicano.

Una colección de diferentes razas de maíz, sobre todo del hemisferio occidental, almacena diversos bancos de germoplasma almacenados en el centro internacional de mejoramiento de maíz y trigo, CIMMYT.

3.1.4. Producción y Rendimientos

El maíz representa la principal fuente alimenticia de México y es el componente más relevante de la producción agrícola. Ha sido y sigue siendo el producto de mayor consumo nacional y por persona en el país; es la fuente principal de carbohidratos, fundamentalmente a través de unos 6.5 millones de toneladas que se consumen directamente como tortillas y alrededor de 2.5 millones de toneladas de otras formas. El volumen de producción durante los últimos años se ha mantenido en aproximadamente 21 millones de toneladas, de las cuales el 89% es de maíz blanco y el resto corresponde a maíz amarillo y a maíces pigmentados. En la actualidad la producción de maíz criollo en México presenta un rendimiento desde 1 ton/ha hasta 3.36 ton/ha (Salinas, 2010). Se estima que la población mundial alcanzará los 8 000 millones en el año 2030, lo cual representa 2000 millones más que en la actualidad. (Ripusudan *et al*, 2001)

El maíz es una de las especies vegetales más productiva, tanto en su producción global, cerca de 600 millones de toneladas por años, como en su productividad, más de 4 ton/ha. Su difusión fue más rápida en las zonas templadas en las cuales representa cerca del 40% del área cosechada y el 60% de la producción mundial. Sin embargo hay variedades de maíz para casi cualquier necesidad específica; existen variedades de 1.5 a 5 metros de altura; diferentes grados de tolerancia al calor, frío o sequía; adaptación a diferentes tipos de suelo, altitud y latitud. El maíz se cultiva desde las costas del Golfo o del Pacífico hasta casi 3000 metros sobre el nivel del mar, se siembra en regiones con precipitación pluvial menor a 400 mm hasta cercana a 3000 mm (Ripusudan *et al*, 2001).

Los principales productores son Sinaloa, Jalisco, México, Michoacán, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Veracruz, Puebla y Oaxaca (Salinas, 2010).

3.2. Colorantes Naturales

La calidad de los alimentos se basa en sus características microbiológicas, color, sabor, textura y valor nutritivo. Dependiendo del alimento en particular, estos factores pesan en grado diverso al evaluar la calidad global, sin embargo, uno de los más importantes atributos de la calidad sensorial de un alimento es el color, razón por la cual la industria de alimentos enfoca gran parte de sus investigaciones a los colorantes. El término colorante es una designación general que se refiere a cualquier compuesto químico que imparte color, mientras que el término pigmentos se refiere a los constituyentes normales de las células o tejidos que imparten color.

Existe mucha información acerca de los colorantes usados en la industria de alimentos clasificándose por su origen en: colorantes naturales, colorantes idénticos al natural y colorantes artificiales (Badui, 2006). Actualmente se ha demostrado que algunos colorantes artificiales son causantes de enfermedades por lo que se ha buscado obtener fuentes naturales de colorantes que además de proporcionar color al producto alimenticio tiene efectos benéficos a la salud, ya que en la planta no solo sirven para dar color sino que tienen funciones de defensa y antioxidantes (Fennema, 2008)

Existe una amplia variedad de colorantes naturales, pueden ser de origen animal, mineral y vegetal, y son estos últimos los más abundantes, pues el color presentado en todas las plantas, frutas y flores es generado por una inmensa cantidad de compuestos diferentes,

los cuales se han clasificado en dos grandes grupos: uno el que tiene cromóforos con sistemas conjugados y otro con porfirinas coordinadas con metales. El primer grupo incluye carotenoides, antocianinas y betalaínas. El segundo, incluye a la mioglobina, clorofila y sus derivados. Sin embargo, la clasificación más usada es determinada por su solubilidad teniéndose los colorantes hidrofóbicos e hidrofílicos. Dentro de los colorantes hidrofóbicos están los carotenoides y de los hidrofílicos están las antocianinas, clorofilas y betalaínas. Con esta variedad de compuestos coloridos es posible encontrar en la naturaleza todos los matices y combinaciones de colores del espectro, existiendo predominio en general de los colores verde, rojo, amarillo y azul.

Estos compuestos coloridos desempeñan un papel fundamental en la naturaleza, interviniendo de forma directa en los procesos de polinización, alimentación, protección, etc. Hoy en día una gran variedad de estos colorantes se usan tanto en la industria farmacéutica y textil como en la industria de alimentos. Debido a que estos colorantes son usados para consumo humano, es necesario tener un control en el método de extracción ya que no se pueden utilizar disolventes u otros reactivos que sean tóxicos. Además es necesaria su caracterización y cuantificación para darles un uso de acuerdo a las propiedades que presenten.

Los colorantes naturales presentan ciertas desventajas frente a los colorantes artificiales, ya que el costo real de su extracción es alto y su estabilidad es limitada ya que su estructura se afecta por cambios de pH, luz, temperatura, presencia de metales y enzimas. Por esta razón es importante encontrar colorantes naturales que sean más estables y cuyo proceso de extracción sea costeable en un proceso industrial.

3.2.1. Estabilizantes

Debido a la inestabilidad de los colorantes naturales es necesario proteger su estructura para tener una mayor estabilidad, esta protección se puede llevar a cabo por medio compuestos como polisacáridos (almidón, maltodextrinas, ciclodextrinas, carboximetil celulosa, gomas arábica, alginato de sodio, etc.), lípidos (ceras y grasas) y proteínas (gelatina, proteína de soja, caseinatos, etc.) (Pedroza, 2002). Este proceso permite la encapsulación de compuestos como agentes saborizantes, edulcorantes, colorantes y

aromatizantes. La encapsulación de pigmentos en estas matrices permite aumentar la vida útil del colorante ya que estos materiales presentan una protección de humedad, oxígeno, calor u otras condiciones extremas (Escalona, 2004).

Existe una amplia variedad de materiales para lograr la encapsulación, sin embargo, es importante considerar las características en cuanto a solubilidad, fuerza, facilidad de aplicación, permeabilidad, ya que todas ellas influirán en las características del producto final (Pedroza, 2002). Dentro de los materiales utilizados en alimentos se encuentra:

Ciclodextrina. Son compuestos macrocíclicos formados por varias unidades de glucosa unidas mediante enlaces α -D-(1-4). A pesar de su alta solubilidad en agua, la cavidad interna de las ciclodextrinas es apolar (Martínez, 2007)

Dextrina. El cual es un polisacárido nutritivo no dulce que consiste en unidades de D-glucosa unidas principalmente por enlaces α -(1-4), presenta baja higroscopicidad, buena solubilidad y bajo poder edulcorante. Se ha usado para la microencapsulación del pigmento luteína-enocianina (Escalona, 2004).

Inulina. Es un polímero de unidades β -D-fructofuranosilo unidas por enlaces 2-1, no son digeribles por el cuerpo humano solo es degradado por la microbiota del colon. Se ha usado para la microencapsulación de compuestos bioactivos del nopal (Beirão da Costa, 2012)

Harina de Amaranto. El almidón del amaranto es distintivo. En forma natural tiene contenidos de amilopectina. Los gránulos de almidón son poligonales y miden de 1-3 micrómetros de diámetro. Debido al tamaño tan pequeño del gránulo de almidón, se ha reportado que cuando es secado por aspersión puede formar agregados esféricos que muestran cavidades donde se pueden incluir y estabilizar sustancias como colorantes y saborizantes (Paredes, 2006).

3.3. Generalidades de Antocianinas

Las antocianinas son el grupo de colorantes hidrofílicos más importantes en la naturaleza. Forman parte de los flavonoides que se caracterizan principalmente por el número de átomos de carbono de su esqueleto básico, siendo C6-C3-C6.

Las antocianinas están formadas por dos grupos aromáticos representados en la figura 9 en donde se muestra un benzopirilio y un anillo fenólico. Esta estructura es la responsable de la coloración que va desde rojo hasta azul, se conocen más de 4000 antocianinas, las cuales se diferencian unas de otras por sus sustituyentes en el esqueleto básico. Se encuentran distribuidas en toda la estructura de la planta y varía su concentración dependiendo del grado de madurez, condiciones de cultivo, proceso, almacenamiento, etc.

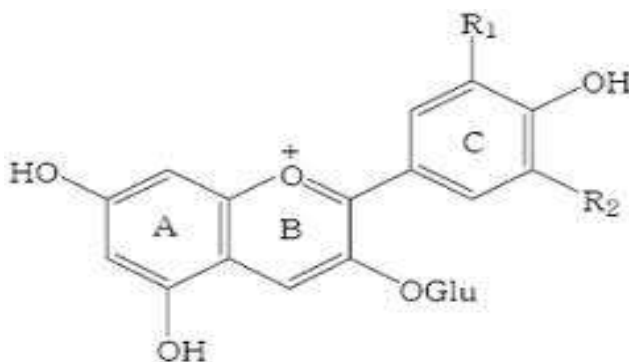


Figura 9. Estructura General de las antocianinas

En la naturaleza las antocianinas se encuentran agrupadas para obtener una mayor estabilidad. Se agrupan con otros fenólicos principalmente mediante puentes de hidrógeno, o interacciones entre anillos bencénicos. Estos complejos se estabilizan por la presencia de metales bivalentes, así como por la sustitución con el ácido cumárico y por la glicosidación, lo que estabiliza el pigmento frente a la acción enzimática y a la luz.

El nivel de hidroxilación o metilación en la molécula determina el color: a mayor hidroxilación se presenta una tonalidad más azul, y a mayor metilación la coloración es roja principalmente.

El azúcar presente en la molécula de las antocianinas les confiere una gran solubilidad y estabilidad, generalmente el azúcar se une a la antocianidina en la posición 3 del grupo fenólico, aunque puede también unirse en las posiciones 5 y 7.

En algunos casos los azúcares están acilados con grupos acilo derivados del ácido acético o derivados del ácido cinámico (p-cumárico, caféico, ferúlico o sinápico).

De esta forma se tiene una gran variedad de antocianinas, de las cuales seis son las más recurrentes: cianidina, pelargonidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina.

Estas moléculas presentan sensibilidad a diversos factores como la temperatura, luz, oxígeno y metales.

La síntesis de antocianinas ocurre en el citoplasma de la célula, cerca del retículo endoplásmico se localiza el conjunto de enzimas que participan en el proceso. Formada la antocianina, se deposita en la vacuola, mediante un fenómeno de transporte, una vez dentro las antocianinas se localizan en pequeños cuerpos esféricos conocidos como “antocianoplastos”. Dentro de los tejidos vegetales se tiene un pH típico entre 3.5 y 5.5. Para mantener el color, las antocianinas se auto-asocian para formar pilas helicoidales mediante atracciones hidrofóbicas y por puentes de hidrógeno entre los núcleos de flavilio. El apilamiento tiende a proteger los grupos cromóforos asociados al azúcar frente a la reacción de hidratación. Otro mecanismo es la copigmentación.

Se han realizado diversas investigaciones sobre la extracción de antocianinas de diferentes fuentes, como la mora, fresa, ciruela, maíz morado, frijoles, entre otros. En la tabla 7 se muestran algunos de los métodos de extracción usados para la obtención de antocianinas de maíz morado.

Tabla 6. Diferentes condiciones de extracción de antocianinas de maíz morado

	Disolvente	Ácido	Núm. de Extracciones que se hicieron a la muestra	Relación Soluta:Disolvente	Tiempo Extracción	de Referencia
Harina de Maíz	Metanol 50%	5% ác. Acético	3	5:1	24 horas	(Salinas <i>et.al.</i> 2003)
Maíz molido	Metanol 95%	5%ác. Acético	1	No especificado	24 horas	(Cuevas, 2008)
Olote de maíz morado	Metanol 100%	Ninguno	1	4:1	24 horas en la oscuridad	(Zhendong Weiwei, 2010)
Cereales	Metanol 85%	1 N HC 15%	1	8:1	30 min	(El-Sayed <i>et al</i> 2006)

3.4. Métodos de Extracción

Los materiales vegetales son recursos invaluable y útiles diariamente, los cuales proveen un recurso interminable de materia prima a las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos. Sus primeros usos en la antigüedad fueron con fines nutricionales pero sus cualidades médicas fueron descubiertas muy pronto por los pueblos antiguos. El interés por los compuestos presentes en plantas de ha intensificado en los últimos tiempos, con la identificación de nuevos compuestos útiles para las distintas industrias y el descubrimiento de nuevas aplicaciones. Se ha determinado que en algunos casos la extracción puede ser más económica que la síntesis química de los compuestos de interés, razón por la cual una extracción que permita mayor productividad es definitivamente el punto de interés de la industria.

Los métodos de extracción clásicos ocupan una cantidad elevada de disolventes orgánicos, se requieren tiempos prolongados y en ocasiones se utiliza una temperatura elevada para mejorar la extracción. En el caso de las antocianinas al ser sensibles al calentamiento y a la luz es necesario tener un método de extracción el cual sea eficiente y permita su estabilidad (Castañeda, 2008)

3.4.1. Métodos clásicos de extracción

Los métodos clásicos o tradicionales de extracción se basan en la solubilidad del compuesto. Dependiendo de ella se elegirá el disolvente para la extracción. Además, es importante conocer qué otros componentes se encuentran interaccionando con el compuesto de interés. El mecanismo de extracción involucra dos fenómenos físicos: difusión a través de la pared celular y el lavado de los contenidos celulares, una vez que las paredes de han roto.

3.4.1.1. Maceración

La extracción por maceración es un proceso de extracción sólido-líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción. Se basa principalmente en la selección de solventes, temperatura y agitación con el fin de incrementar la solubilidad de los materiales y la tasa de transferencia de masa. Se separan

los compuestos con base en sus solubilidades. Existen dos métodos de maceración de acuerdo a la temperatura, los cuales son: *maceración en frío* la cual consiste en sumergir el producto con la cantidad suficiente de solvente para cubrirlo totalmente, presentando la ventaja de utilizar equipos simples y cantidades mínimas de energía y no altera las propiedades de lo que se desea extraer. El otro método es la *maceración en caliente*, el cual es similar al método de maceración en frío con la única diferencia del uso de temperatura, la cual acelera el proceso. Sin embargo, la desventaja de este último es que puede destruir algunas propiedades del compuesto de interés, ya que muchas veces se trata de compuestos termolábiles.

3.4.2. *Métodos modernos de extracción*

Aunque los métodos clásicos han brindado buenos resultados, la industria considera esencial el desarrollo de nuevos métodos y técnicas que mejoren las condiciones de procesado. Las tecnologías novedosas significan un menor consumo de energía, son menos contaminantes y permiten realizar procesos químicos más selectivos. Dentro de estas tecnologías se incluyen fluidos súper críticos, alta presión, ultrasonidos, microondas, etc.

3.4.2.1. *Sonicación*

La extracción usando la sonicación se basa en la emisión de ondas de sonido cuya frecuencia es más alta de la que el oído humano puede captar. Se pueden distinguir dos zonas de ultrasonidos: la primera incluye las ondas de alta frecuencia (1-10MHz), cuya energía es baja: la segunda se refiere a las ondas de baja frecuencia (20-200 kHz) y corresponde a los ultrasonidos de mayor energía.

Los ultrasonidos ejercen su efecto a través de burbujas de cavitación. Estas se forman en el ciclo de depresión de la onda, cuando la estructura del líquido literalmente se abre por la presión negativa para formar burbujas microscópicas. Las ondas ultrasónicas dan como resultado la separación molecular formando “microburbujas” o cavidades (cavitación). Las ondas van influyendo en la formación de las burbujas en función del tiempo. Una vez que la burbuja tiene un tamaño considerable, se desplaza a otro lugar de mayor presión, siendo en este punto donde la burbuja instantáneamente implota, produciendo presiones de unas

500 atm y unos 5°C de temperatura. Esta presión y temperatura producida en un punto muy pequeño produce la ruptura de las paredes celulares. Además la onda de choque que produce la ruptura de burbujas rompe la estructura del disolvente, lo que afecta la reactividad al alterar la solvatación de especies reactivas. En medios heterogéneos sólido-líquido actúan produciendo fragmentaciones y reducción del tamaño de partícula que proporciona nueva superficie aumentando el área efectiva disponible, el ultrasonido además facilita la rehidratación del tejido si se están utilizando materiales secos al abrir los poros, lo cual a su vez incrementa el transporte de masa de los constituyentes solubles por difusión y procesos osmóticos.

El ultrasonido se ha usado para la extracción de diferentes compuestos como el licopeno a partir del tomate, así como para la extracción de antocianinas, ya que es un proceso que no involucra calentamiento. Se han usado equipos que alcanzan 1500W de potencia y el tiempo máximo de extracción es de 2-10 min (Tiwari *et al*, 2010).

3.4.2.2. *Microondas*

La región de microondas del espectro electromagnético está asociada a longitudes de onda de 1cm a 1m. Las longitudes de onda entre 1 cm y 25 cm se utilizan para transmisiones de radar y las restantes se utilizan para telecomunicaciones. Para las aplicaciones comerciales la frecuencia de microondas está regulada en 2450 MHz. La energía transmitida por la radiación es de 0.13 cal/mol.

La radiación con microondas es un modo alternativo de introducir energía térmica. La calefacción dieléctrica con microondas utiliza la posibilidad de algunos sólidos o líquidos de transformar la energía electromagnética en calor. Este modo de conversión de la energía *in situ* tiene muchos atractivos ya que su magnitud depende de las propiedades de las moléculas, por lo que puede utilizarse para obtener selectividad.

Con microondas, la transferencia de energía no se produce por convección o conducción como en la calefacción convencional, sino por pérdidas dieléctricas. La propensión de una muestra a calentarse con microondas depende de sus propiedades dieléctricas, el factor de pérdida dieléctrica y la constante dieléctrica. Como guía, se considera que compuestos con constantes dieléctricas grandes tienden a calentarse rápidamente con microondas,

mientras que sustancias menos polares o compuestos que no tienen momento dipolar y compuestos cristalinos altamente ordenados absorben pobremente.

La energía de microondas se deposita directamente en el material calentado, por tanto el interior del objeto puede calentarse sin mediación de calefacción conductiva y generalmente las temperaturas en el interior de los materiales son mayores que cerca de la superficie. Por este motivo la calefacción con microondas se considera una calefacción volumétrica, ya que se calienta el volumen del material y no la superficie. Por ello es ventajoso emplear recipientes cilíndricos que tienen una baja relación superficie: volumen.

La característica más conocida de la radiación con microondas es la extraordinaria velocidad de calefacción, el efecto de aceleración y por lo tanto la reducción de tiempos se ha aplicado con éxito para la extracción de muestras y para reducir el tiempo de reacción de numerosos procesos.

La extracción por microondas se usa para la obtención de metabolitos secundarios, flavonoides, quinonas, terpenoides y alcaloides, la éxito de la extracción depende de varios factores como la potencia, frecuencia, tiempo, tamaño de partícula, húmedas de la muestra, tipo y concentración de solvente, relación solido:líquido, temperatura de extracción, presión así como el número de extracciones. Se han usado microondas para la extracción de quinonas donde se ha encontrado que la actividad antioxidante es igual a la obtenida por la extracción con Soxhlet, y mucho mayor a la actividad obtenida por maceración y ultrasonido (Zhang *et al*, 2011).

3.4.2.3. *Extracción asistida por enzimas*

La extracción de compuestos bioactivos asistida por enzimas se basa en la propiedad que tienen las enzimas para hidrolizar los polisacáridos de la pared celular y membranas de los vegetales, ya que como consecuencia de esta hidrólisis se incrementan la formación de poros y el tamaño de estos; por lo tanto permite una mejor difusión del solvente a través del tejido de las frutas o vegetales, dando como resultado una mayor y rápida recuperación de los compuestos extraídos. Las enzimas tienen la propiedad de catalizar reacciones con gran especificidad y regioselectividad, sin que interaccionen con el compuesto que se

desea extraer. Además, este método de extracción brinda la posibilidad de realizar la extracción usando tecnologías más limpias para el cuidado del medio (Puri *et al*, 2012).

El uso de enzimas como un tratamiento previo en la extracción ayuda disminuir el uso de solventes y tiempo de extracción aumentando su rendimiento.

Las enzimas más utilizadas para la extracción son las celulasas, pectinasas y hemicelulasas, ya que el principal componente estructural de los vegetales es la celulosa, la cual funciona en la materia prima vegetal como un secuestrador o barrera estructural que limita la liberación de los componentes de interés (Figura 10).

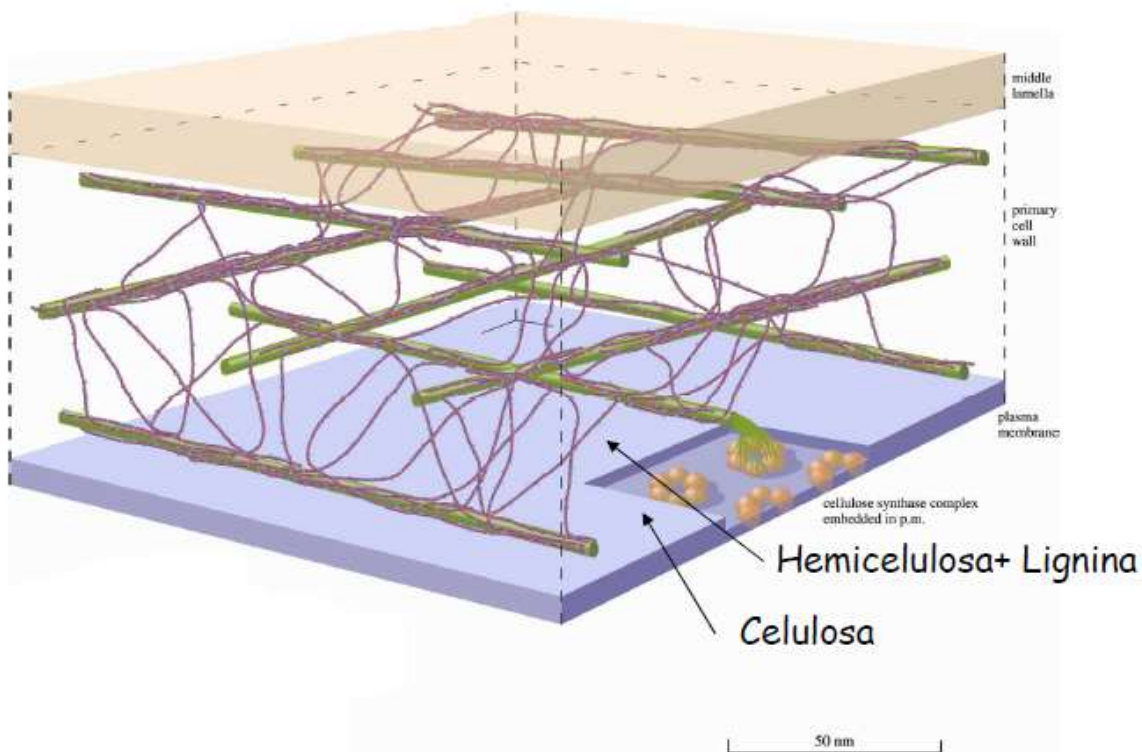


Figura 10. Estructura de la pared celular, compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina.

La celulosa es un polisacárido formado por unidades de glucosa, las cuales se mantienen unidas mediante enlaces β -1,4-glucosídicos. Pero además, la configuración β le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cuales no se presentan aisladas sino unidas entre sí mediante enlaces de hidrógeno intramolecular, formando una estructura supramolecular cristalina y organizada, resistente a la hidrólisis. La acción enzimática para

Llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinérgica de un grupo de celulasas, que presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa. El sistema celulasa típico incluye tres tipos de enzimas: la endo- β -1,4-glucanasa, la exo- β -1,4-glucanasa y la β -1,4-glucosidasa (celobiasa). El mecanismo para la degradación de la celulosa puede resumirse en tres etapas: Primero la endo- β -1,4-glucanasa actúa al azar sobre los enlaces β -1,4 glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de celulosa, y convierte las cadenas largas a oligosacáridos, los cuales mantienen la configuración β de su estructura. La acción de esta enzima es sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato para la segunda etapa, en la cual actúa la exo β -1,4-glucanasa, la cual es una enzima que corta la cadena 1,4 β -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, lo que provoca la remoción de unidades de celobiosa o glucosa. Ambas enzimas endoglucanasa y exoglucanasa son inhibidas por uno de los productos de la hidrólisis enzimática, la celobiosa, lo que disminuye la eficiencia de la hidrólisis. Una vez degradada las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa. Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la β -1,4-glucosidasa, porque las glucanasas son inhibidas por la celobiosa.

La extracción asistida por enzimas ha permitido obtener caroteno, licopeno, capsaicina, antocianinas, inulina, pectina, flavonoides, catequinas, entre otros. El uso de enzimas mejora la extracción de compuestos fenólicos de un 32.33 a un 61.90% (Puri *et al*, 2012).

4. HIPÓTESIS

Si las antocianinas están ligadas covalentemente a la pared celular, al usar métodos físicos o biológicos que rompan esta estructura, se facilitara la difusión del disolvente teniendo una mayor interacción con las antocianinas logrando así un mayor rendimiento en su extracción.

5. OBJETIVOS

5.1. *Objetivo General*

- Determinar las condiciones óptimas para extraer las antocianinas presentes en el totomoxtle y el olote de maíz criollo mediante tecnologías de extracción alternativas
- Evaluar la estabilidad del extracto de antocianinas obtenido del totomoxtle frente a diferentes ácidos y a vehículos como la inulina, dextrina y harina de amaranto.

5.2. *Objetivo Particular*

- Determinar el tiempo de extracción, disolvente y ácido a utilizar, relación soluto:disolvente y número de extracciones para obtener las antocianinas del totomoxtle por el método de maceración.
- Evaluar la potencia del sonicador y determinar el tiempo óptimo de extracción para las antocianinas del totomoxtle
- Cuantificar las antocianinas del olote obtenidas por el método óptimo de sonicación.
- Determinar el tiempo óptimo de extracción para el método de microondas
- Cuantificar las antocianinas del olote obtenidas por el método de microondas con el mejor tiempo de extracción.
- Para el método enzimático obtener las condiciones de acción enzimática para la extracción de antocianinas a partir del residuo de la extracción del totomoxtle.
Evaluar la estabilidad de antocianinas frente a diferentes ácidos y vehículos usando un extracto de antocianinas del totomoxtle.

6. ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL

Para lograr los objetivos planteados se diseñó el siguiente diagrama general:

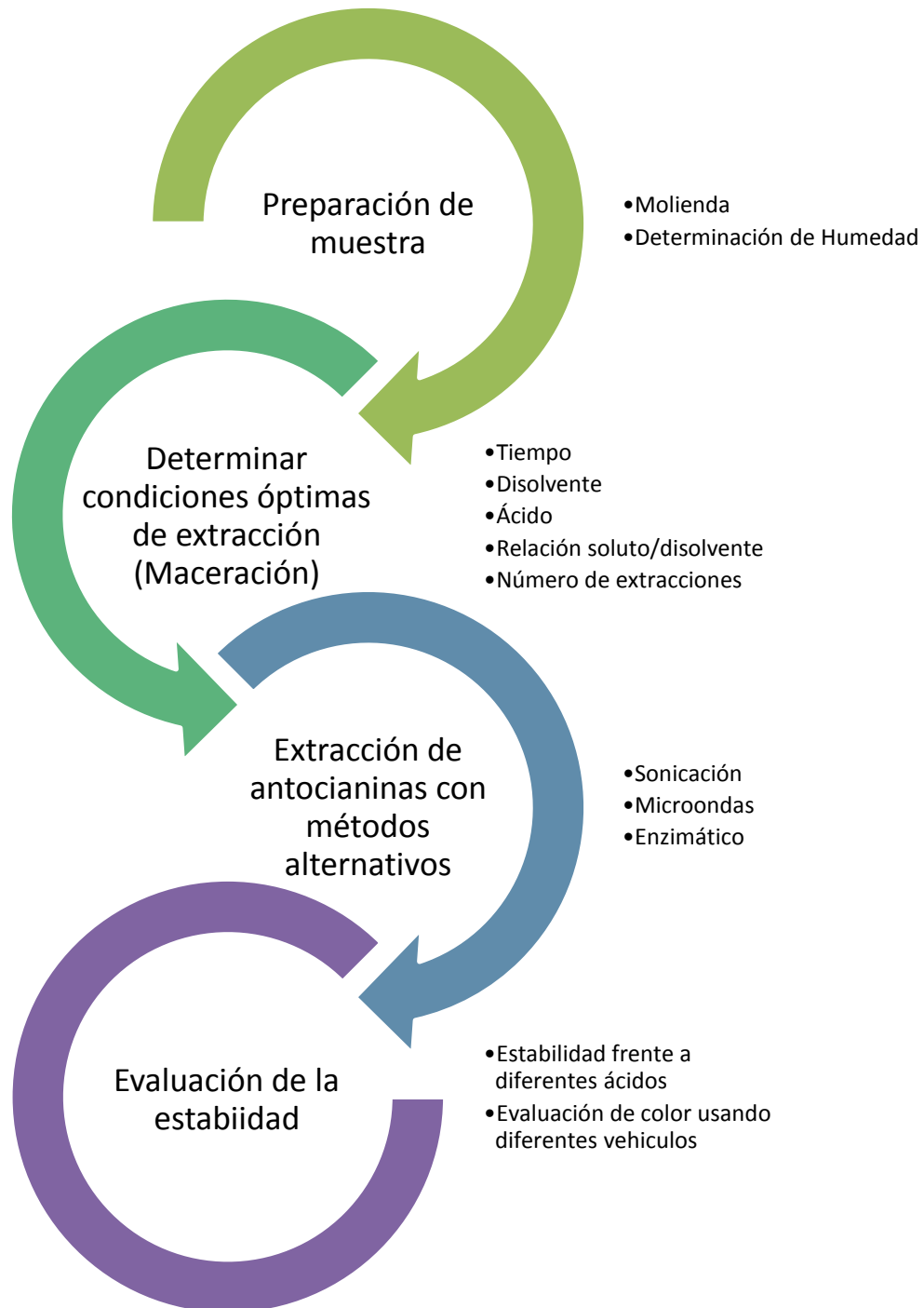


Figura 11. Proceso general del proyecto, donde se muestran las cuatro etapas del proyecto

El trabajo se dividió en cuatro etapas:

PRIMERA ETAPA Preparación de la muestra.

TOTOMOXTLE: Todas las hojas se cortaron en cuadros de 2 a 4 cm aproximadamente para posteriormente molerlas en un molino KRUPS GX4100 durante periodos de 2 minutos hasta obtener un tamaño de partícula uniforme. Este material se pasó por un tamiz No. 60 y se obtuvo un tamaño de partícula de 0.24mm.

OLOTE: Del olote solo se usó la superficie, por lo que esta parte se separó con ayuda de un rallador, y se obtuvo únicamente la parte colorida, éste se pasó por el molino durante periodos de 2 minutos hasta obtener un tamaño de partícula de 0.24 mm.



A las muestras ya molidas se les determinó humedad por el método de estufa a una temperatura de 90°C durante 24 horas. Las muestras ya molidas se almacenaron en un anaquel protegido de la luz a temperatura ambiente para su posterior análisis.

SEGUNDA ETAPA. Determinación de condiciones óptimas de extracción

El objetivo de esta segunda etapa fue encontrar cuales son las condiciones óptimas de extracción de antocianinas. Las variables que se estudiaron fueron: disolvente, tiempo, relación soluto/disolvente, número de extracciones y tiempo de extracción; manteniéndose constante la agitación, luz, y una atmósfera inerte.

Se usó el método de metanol 80% acidificado al 1% con ácido acético debido a que es el que ha demostrado en diferentes investigaciones (Øyvind y Kenneth, 2006) mejores resultados en la extracción de antocianinas, se decidió estudiar el efecto 4 ácidos, además del acético, que fueron: el tartárico, láctico, cítrico y ferúlico, y la relación soluto disolvente desde 1:200 hasta 1:10 y se determinaron antocianinas totales en la primera y segunda extracción (figura 12).

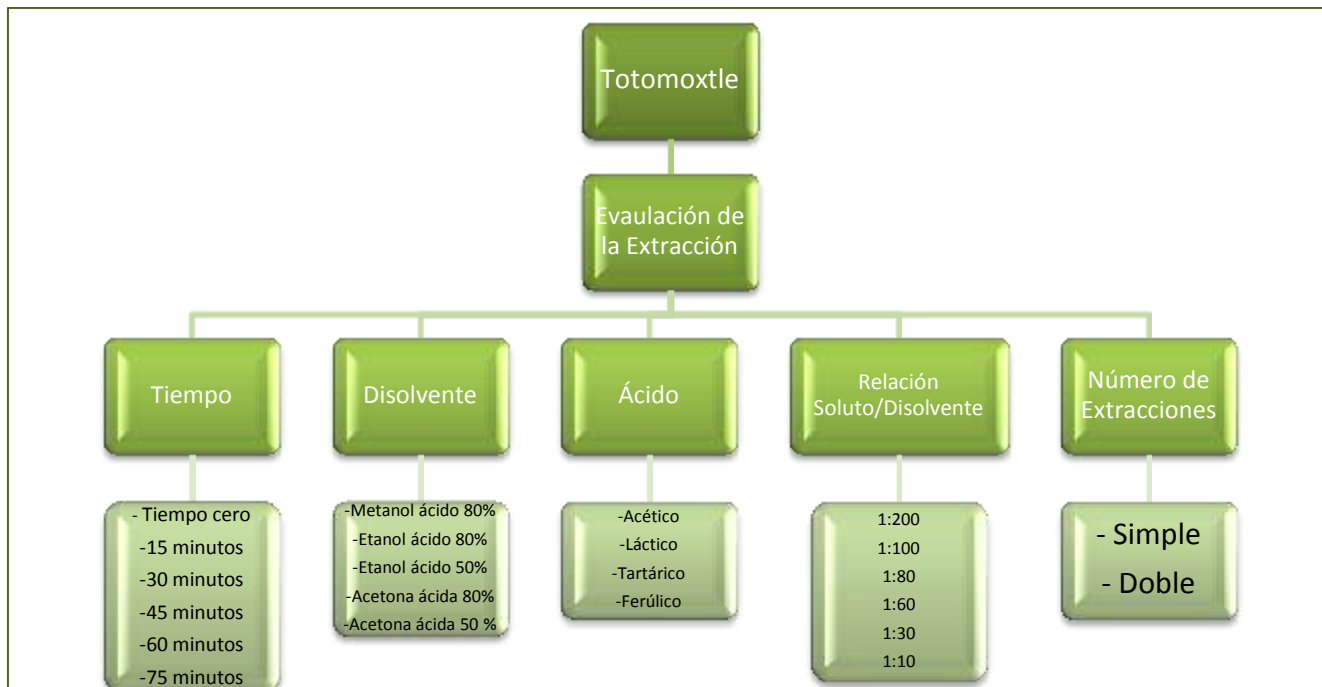


Figura 12. Diagrama Experimental de la determinación de condiciones óptimas de extracción.

- a) Se pesaron 0.5 gramos del totomoxtle y se le adicionó 5 mL de disolvente.
- b) Se cubrió con aluminio y se les inyectó nitrógeno durante 2 minutos para asegurar el desplazamiento del oxígeno.
- c) Se agitó durante 15, 30, 45, 60 y 75 min, a temperatura ambiente y a 300 rpm.
- d) Se filtró con vacío usando nylon como filtro para evitar la pérdida de antocianinas.
- e) Se realizó la segunda extracción, con la misma cantidad de disolvente.
- f) Los dos extractos obtenidos de juntaron,
- g) Se evaporó el disolvente en el rotavapor hasta obtener un extracto rico en antocianinas.
- h) Se aforó el extracto a 5 mL con agua acidificada con ácido láctico al 40% para obtener un pH de 2 y realizar las mediciones correspondientes.

En la tercera etapa se evaluaron los diferentes métodos de extracción con el olote y el totomoxtle. En esta etapa se buscó determinar la eficiencia de cada método y obtener las mejores condiciones de las variables más significativas de cada uno de los métodos de extracción estudiados. Las pruebas para la evaluación se hicieron únicamente con el totomoxtle y ya obtenidas las mejores condiciones se aplicaron al olote.



Figura 13. Diagrama experimental de la extracción de antocianinas por diferentes métodos

SONICACIÓN

- Se pesaron 0.5 gramos del totomoxtle y se le adicionó 5 mL de etanol 80%
- Se les inyectó nitrógeno durante 2 minutos para asegurar el desplazamiento del oxígeno.
- Se sonicó durante 15, 30, 45 y 60 a temperatura ambiente, usando un sonicador de 70 y 100 W.
- Se filtró con vacío usando nylon como filtro para evitar la pérdida de antocianinas.
- Se realizó la segunda extracción, con la misma cantidad de disolvente.
- Los dos extractos obtenidos se juntaron,
- Se evaporó el disolvente en el rotavapor hasta obtener un extracto rico en antocianinas.
- Se aforó el extracto a 5 mL con agua acidificada con ácido láctico al 40% para obtener un pH de 2 y realizar las mediciones correspondientes.

MICROONDAS

- a) Se pesaron 2 gramos del totomoxtle y se le adicionó 20 mL de etanol 80%
- b) Se colocó en un baño de hielo
- c) Se sometió la muestra a pulsos de 30 segundos, se dejó enfriar y se sometió a otros 30 segundos, dependiendo del tiempo a evaluar.
- d) Se filtró con vacío usando nylon como filtro para evitar la pérdida de antocianinas.
- e) Se realizó la segunda extracción, con la misma cantidad de disolvente.
- f) Los dos extractos obtenidos se juntaron.
- g) Se evaporó el disolvente en el rotavapor hasta obtener un extracto rico en antocianinas.
- h) Se aforó el extracto a 5 mL con agua acidificada con ácido láctico al 40% para obtener un pH de 2 y realizar las mediciones correspondientes.

ENZIMÁTICO

- a) Se pesaron 0.5 gramos del residuo obtenido de la extracción del totomoxtle
- b) Se le adicionó 5 mL de buffer de citratos pH 5 y pH 3.
- c) Se agregó el 10, 15 y 20% de enzima (Xylanases, Celluclast 1.5L y Depol 740)
- d) Se cubrió el matraz con aluminio
- e) Se le inyectó nitrógeno durante 2 minutos para asegurar el desplazamiento del oxígeno.
- f) Se agitó a 300 rpm por 6, 12 y 24 horas a una temperatura de 30°C, 40°C y 50°C
- g) Se filtró con vacío usando nylon como filtro para evitar la pérdida de antocianinas.
- h) Se evaporó el buffer en el rotavapor hasta obtener un extracto rico en antocianinas.
- i) Se aforó el extracto a 5 mL con agua acidificada con ácido láctico al 40% para obtener un pH de 2 y realizar las mediciones correspondientes.

Para la etapa final proyecto se evaluó la estabilidad de las antocianinas de totomoxtle frente a diferentes vehículos y ácidos de acuerdo a los materiales usados por Escalona en 2004 y Beirão da Costa en el 2012 ya que reportan el uso de dextrinas e inulina para la encapsulación de colorantes y compuestos bioactivos y se decidió evaluar la efectividad de la harina de amaranto como vehículo para la protección de las antocianinas debido a la estructura que presentan los granulos de almidón lo que podría ayudar a proteger al colorante (Paredes, 2006).

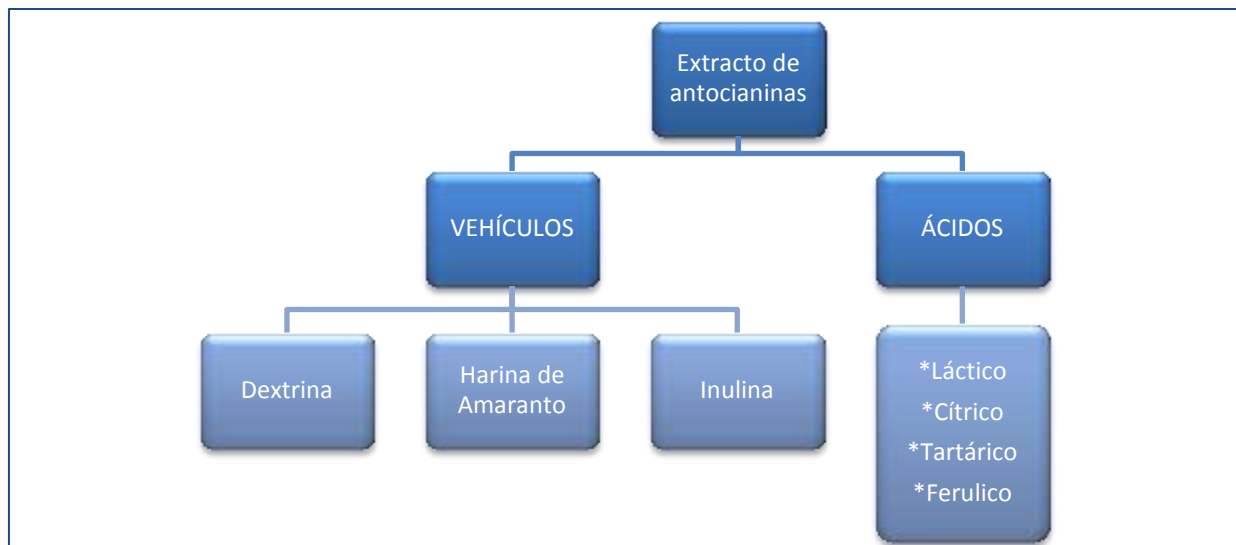


Figura 14. Diagrama experimental para la evaluación de la estabilidad en diferentes ácidos y vehículos

ESTABILIDAD FRENTE A DIFERENTES ÁCIDOS.

- a) Se pesaron 0.5 gramos del totomoxtle y se le adicionó 5 mL de etanol al 80% con 1% de ácido tartárico, láctico, cítrico y ferúlico.
- b) Se cubrió con aluminio y se les inyectó nitrógeno durante 2 minutos para asegurar el desplazamiento del oxígeno.
- c) Se agitó durante 30 min, a temperatura ambiente y a 300 rpm.
- d) Se filtró con vacío usando nylon como filtro para evitar la pérdida de antocianinas.
- e) Se realizó la segunda extracción, con la misma cantidad de disolvente.
- f) Los dos extractos obtenidos de juntaron,
- g) Se evaporó el disolvente en el rotavapor hasta obtener un extracto rico en antocianinas.
- h) Se aforó el extracto a 5 mL con agua acidificada con el mismo ácido usado en la extracción

- i) Se determinaron antocianinas totales al tiempo cero, 20, 30, 40, 80 y 100 días.

EVALUACIÓN DEL COLOR USANDO DIFERENTES VEHÍCULOS

Para esta etapa se extrajo suficiente cantidad de extracto de antocianinas a partir del totomoxtle usando el método de sonicación.

- a) Se pesaron 2 gramos de extracto obtenido.
- b) Se le agregó el vehículo (harina de amaranto, inulina y dextrina) poco a poco y se paso a un mortero para homogeneizar y obtener un polvo el cual no presente grumos, esta es la presentación sólida.
- c) Del polvo obtenido pesar 1 gramos y aforar a 10 ml con agua, esta es la presentación líquida.
- d) Medir color por medio del colorímetro.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Equipos

- Licuadora Osterizer
- Molino KRUPS GX4100
- Agitadora Thermo scientific
- Rotavapor R-215, con baño de calentamiento B-491, controlador de vacío V-850, bomba de vacío V-700 marca Büchi.
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC: Autoinyector Waters 2707, bomba Waters 1525 marca Waters, detector UV Waters 2478 y Desgasificador se usó el Software Empower.
- Columna Hypersil GOLD 250 x 4.6 mm 5 µm. Marca Thermo scientific
- Balanza analítica OHAUS AP1105
- Espectrofotómetro GBC-CINTRAL
- Microondas Daewo 600 W, 2450 MHz
- Sonicador branson 1510 potencia: 70 W, 42 KHz
- Sonicado branson 3510 potencia: 100 W, 42KHz
- Colorímetro Minolta CM-3600d
- Depol740L proveedor Biocatalysts. Su principal actividad es como feruloilesterasa (36 U/g), obtenida de *Humicola sp*
- Xilanasas. Su principal actividad es como pentosanasas y pectinasas (1170 U/g) obtenida a partir de la fermentación del olote de *Aspergillus flavipes*. La enzima fue concentrada por ultrafiltración.
- Celluclast 1.5L proveedor novozymes. Su principal actividad es como celulosas (700 U/g) es producida por la fermentación sumergida de una cepa de *Trichoderma* y cataliza la descomposición de la celulosa en glucosa, celobiosa, y polímeros superiores de glucosa.

7.1. Datos de la muestra

En este proyecto se analizan el totomoxtle y olote de maíz criollo proveniente de la región de Ixtenco-Tlaxcala.

El material obtenido fue de un solo productor y todo el material se homogeneizó al mismo tiempo para tener la misma muestra durante todo el proyecto.



7.2. Determinación de Antocianinas Totales

Considerando el pH como uno de los principales factores del medio que afecta la estabilidad del color de las antocianinas, los espectros de UV-VIS a diferentes valores de pH también varían, usando esta propiedad se puede saber si las antocianinas están o no polimerizadas. La concentración de antocianinas entonces se determinó por absorbancia usando el método pH-diferencial. Estas moléculas dan dos bandas de absorción en la región UV (260-280 nm) y la región visible (490-550 nm). El método de pH-diferencial propuesto por Giustin y Wrolstad en el 2001 permite la estimación alternativa del contenido de antocianinas totales, incluso en la presencia de pigmentos polimerizados y otras interferencias.

Las mediciones se hicieron a partir de una dilución del extracto obtenido ya que la concentración de antocianinas sobrepasa el límite máximo de cuantificación, el factor de dilución usado fue de 10 y de este extracto se tomaron 200 μL y se mezclaron con 1.800 μL de buffer de acetatos 0.4 M y cloruros 0.025 M para realizar una medición de absorbancia a pH 4.5 y la otra de pH 1.

Se midió la absorbancia en el espectro visible (510 y 700 nm) mediante el espectrofotómetro Uv-Vis GBC-Cintra. El contenido de antocianinas totales se expresa como mg/L de cianidina 3-glucósido. Para el cálculo se usan las siguientes ecuaciones:

$$A_T = (A_{\text{max. vis}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{\text{max vis}} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}4,5} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$Ant_T = \frac{A_T \times PM \times FD \times 1000}{\epsilon \times l} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

PM: cianidina-3-glucósido: 449.2 g/mol

FD: Factor de dilución. (10)

ϵ : Absortividad molar de la cianidina.-3-glucósido: 26900 L/cm mg

La concentración final de antocianinas en mg/g se calcula en base al volumen de extracto y peso de la muestra, tomando en cuenta la dilución que se hizo a partir del extracto.

7.3. Determinación de Fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se usó la técnica de Folin-Ciocalteu, la cual es la más empleada. Se fundamenta en el poder reductor del reactivo de Folin, que es una mezcla de ácido fosfotungstácico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). La absorbancia de color azul se mide a 760 nm.

Se tomaron 200 μ L del extracto y se agregaron en 2 mL de carbonato de sodio y se dejaron 2 min. Se le añadió el reactivo de Folin Ciocalteu diluido con agua (1:1) y se dejó por 30 min.

Se midió la absorbancia a 760 nm.

Para conocer la concentración de polifenoles totales se elaboró una curva patrón con ácido tánico en un rango de concentración de 0-1 mg_{ac tánico}/mL.

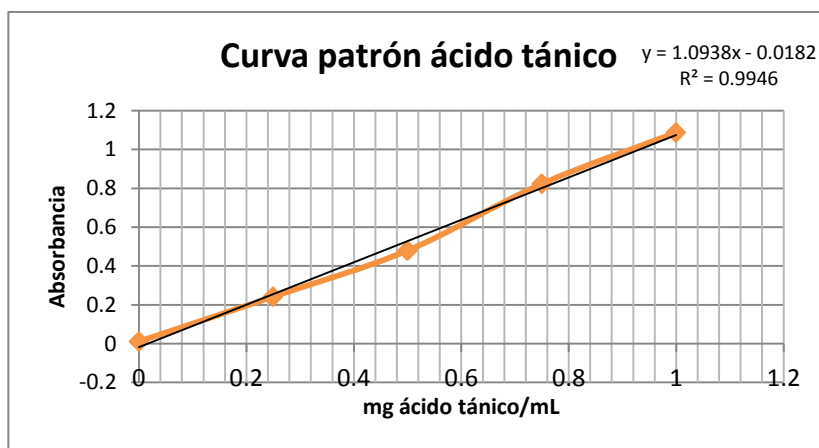


Figura 15. Curva patrón para la cuantificación de fenoles totales.

7.4. Cuantificación por HPLC

Para la identificación del perfil de antocianinas se usó la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) ya que es el método más común para obtener el perfil de antocianinas. El extracto que se inyectó fue el obtenido de la dilución 1:10 con 40% de ácido acético en todos los casos para obtener un pH de 2 y lograr la correcta separación de las señales en el HPLC.

La separación de las antocianinas se llevó a cabo en una columna Hypersil Gold (250x4.5 mm, 5 μ m) usando un sistema HPLC con detector dual de absorbancia. El flujo fue de 1.2 mL/min, se usó un sistema de gradiente usando de fase móvil dos disolventes los cuales fueron A: ácido acético 10% y B: metanol:agua:ácido acético (50:40:10). El gradiente utilizado fue 0-5 min 90% A y 10%B; 5-10 min 100%B; 10-20 min 90% A y 10%B.

7.5. Evaluación instrumental de color

Para la medición del color de manera instrumental se usó el sistema de medición CIELAB



el cual expresa la luminosidad L^* (claro u oscuro), indican la orientación del color, el parámetro a^* expresa la tendencia de color al rojo cuando el valor es positivo y al verde cuando el valor es negativo y el parámetro b^*

indica una tendencia al amarillo cuando es positivo y azul cuando el valor es negativo.

El equipo utilizado es el Minolta CM-3600d. Debido a que se tenían el polvo y el líquido se determinó la reflectancia en el caso del polvo y la transmitancia en el caso del líquido. Las condiciones del equipo se expresan en la siguiente tabla.

Tabla 7. Condiciones que se usaron para la determinación del color.

Parámetro	Condiciones
No. de disparos	3
Estándar	Nulo
Energía UV	Incluida
Componente especular (SC)	Pequeño 4 mm
Iluminante	D65(Luz de día, natural 6,500K)
Detector	10°
Sistema de reporte de color	CIE L*a*b*, Hunter Lab.

7.6. *Análisis Estadístico*

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Se calculó la media de las replicas realizadas así como la desviación estándar y el coeficiente de variación en todas las determinaciones.

Para el análisis de los datos se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de cada una de las determinaciones y posteriormente se aplicó un análisis de diferencia mínima significativa.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se mostrarán los resultados obtenidos de las cuatro etapas del proyecto

ETAPA 1

8.1. *Preparación de la muestra*

Los resultados de humedad del olote y del totomoxtle son 5.9 y 4.5 % respectivamente, estos valores bajos de humedad ayudan a una mejor molienda. Por otra parte no se necesita tener un lugar especial para su almacenamiento.

Tabla 8. Humedad del olote y totomoxtle determinada por el método de estufa.

	% Humedad
Olote	5,90±0.20
Totomoxtle	4,47±0.15

ETAPA 2

8.2. *Condiciones óptimas de extracción.*

En esta etapa de proyecto se determinaron las mejores condiciones de extracción de antocianinas del totomoxtle. Se evaluaron el disolvente, tiempo, relación soluto: disolvente (S/D), número de extracciones y por último el ácido a utilizar. Se mantuvieron constantes la atmósfera de nitrógeno, la ausencia de luz y la agitación, que fue de 300 rpm. Las condiciones de extracción de antocianinas provenientes de maíz morado realizadas en diferentes investigaciones (tabla 7) muestran que los mejores tiempos de extracción son de 24 horas y como disolvente metanol con ácido acético.

8.2.1. Disolvente

Con el fin de optimizar la extracción de antocianinas se llevaron a cabo una serie de experimentos para determinar qué disolvente y en que concentración se logra la máxima extracción. Se usaron cinco disolventes:

- ✿ MetOH:H₂O:CH₃COOH (80:19:1) → Metanol 80%
- ✿ EtOH:H₂O:CH₃COOH(80:19:1)→ Etanol 80%
- ✿ EtOH:H₂O:CH₃COOH(50:49:1) → Etanol 50%
- ✿ CH₃COCH₃:H₂O:CH₃COOH (80:19:1) → Acetona 80%
- ✿ CH₃COCH₃:H₂O:CH₃COOH (50:49:1) → Acetona 50%

Estos disolventes son los más utilizados en la extracción de antocianinas, especialmente el metanol y el etanol, pero también se ha reportado el uso de acetona en frutos rojos donde los resultados obtenidos son más eficientes y reproducibles (Shipp y El-Sayed, 2010).

Se usó el metanol como disolvente de referencia debido a que es el disolvente más utilizado en la extracción de antocianinas ya reportadas (tabla 7). En la industria alimenticia el metanol presenta una serie de restricciones por su toxicidad, por lo que es necesario buscar disolventes alternativos para la extracción. En este caso se probaron el etanol y la acetona, que son disolventes polares los cuales han reportado buenos rendimientos en la extracción de antocianinas y son disolventes aprobados por la FAO y la OMS (Codex).

En el proceso de extracción hay muchas moléculas de disolvente unidas a cada antocianina y es la formación de dichas interacciones la que proporciona la energía necesaria para que se rompan los enlaces y/o interacciones que mantienen unidas las antocianinas en la célula. Cada disolvente tiene una interacción específica con las antocianinas, por lo que es necesario evaluar cual es adecuado para la extracción.

Tabla 9. Concentración de antocianinas (mg_{cyd}/g) con diferentes disolventes

Metanol 80%	Etanol 80%	Etanol 50%	Acetona 80%	Acetona 50%
22.45	21.00	19.35	19.40	17.17
20.77	19.74	19.32	16.91	17.01
21.79	20.52	20.46	18.26	16.10
21.67±0.85	20.42±0.63	19.71±0.65	18.19±1.25	16.76±0.58

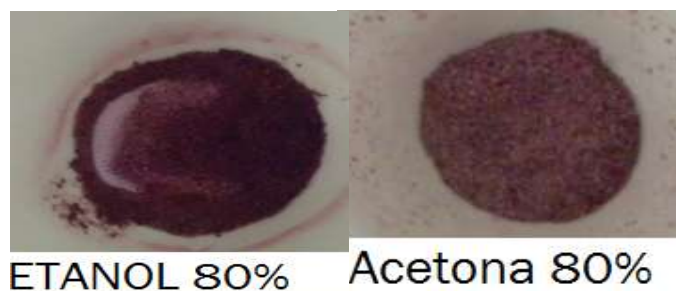


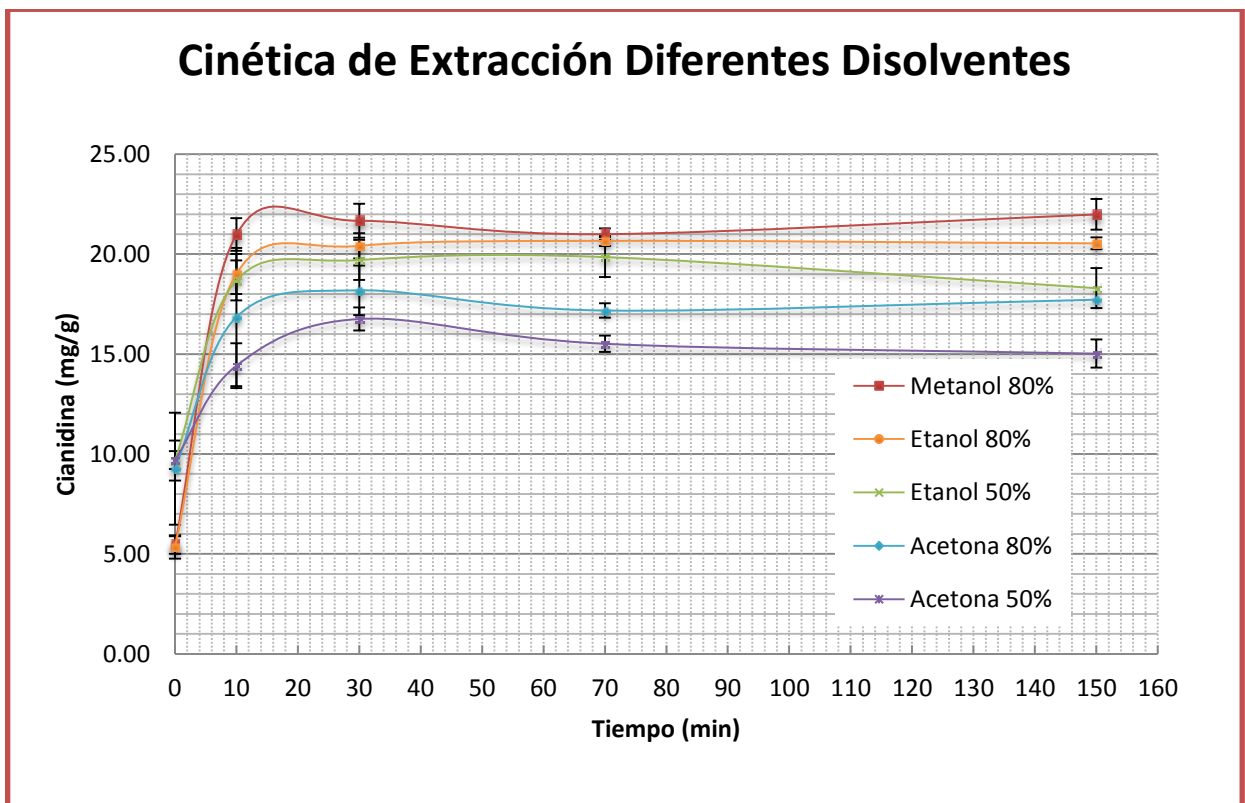
Figura 16. Residuo obtenido en la extracción con etanol y con acetona.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9 los cuales se analizaron con una ANOVA. Los resultados obtenidos muestran que si hay una diferencia significativa entre los disolventes por lo tanto, se hizo la prueba de diferencia mínima significativa lo que demuestra que la extracción con diferentes disolventes varía la eficiencia de la extracción dando como mejor resultados después del metanol, el etanol al 80% con una concentración de antocianinas de $20.42 \pm 0.63 \text{mg}_{\text{cyd}}/\text{g}$ que representa un 94% de la extracción con referencia al método de metanol. Al aumentar la polaridad del disolvente usando el etanol al 50% se extrae el 91% de las antocianinas, y al usar acetona al 80% el rendimiento de la extracción es del 84%, y con acetona al 50% es del 77%. Se concluye que el mejor disolvente para la extracción es el metanol al 80%, sin embargo, debido a que las antocianinas están enfocadas al uso en alimentos no esta permitido debido a su toxicidad, por lo tanto, se eligió el etanol al 80% como mejor disolvente para la extracción de antocianinas para uso alimenticio. La extracción con acetona muestra una disminución en la cantidad de antocianinas totales y el residuo obtenido presenta una menor coloración, Castañeda y colaboradores en el 2008 realizaron una revisión sobre la química de las antocianinas en donde mencionan que los extractos obtenidos con acetona presentan una modificación en la estructura de las antocianinas, fenómeno que no se presenta con etanol ni metanol, lo cual puede deberse a la formación de piranoantocianinas formadas por la oxidación de antocianinas, por lo cual se concluye que la acetona no es óptima para la extracción de antocianinas del totemoxtle (Castañeda et al, 2008). Otro factor que podría afectar la extracción con acetona es su polaridad, ya que de los disolventes usados es el menos polar lo que afecta la solubilidad de las antocianinas, sin embargo su constante dieléctrica, que es una medida de la polaridad de un disolvente, es similar a la del etanol los cuales tienen valores de 21ϵ y 24ϵ mientras que el metanol presenta una constante dieléctrica de 33ϵ mayor a los otros dos disolventes.

8.2.2. Tiempo de extracción

Con el fin de determinar el tiempo mínimo de extracción en el cual se extrajeran la mayor cantidad de antocianinas presentes en las muestras se realizó una cinética de extracción haciéndola con los disolventes ocupados en la sección anterior dando como resultados los mostrados en la gráfica 1 donde se observa que el tiempo de extracción óptimo es de 30 minutos. El tiempo de extracción determinado es congruente con los datos reportados en la literatura mediante el método de maceración ya que se reporta un tiempo de extracción de 30 min con metanol y ácido clorhídrico (El- Sayed *et al*, 2006).

El tiempo de extracción fue el mismo para los 5 disolventes, lo que significa que su penetración a la célula es semejante en todos los casos. Las antocianinas presentan una mayor solubilidad en el metanol, por lo cual éste logra extraer el mayor porcentaje de antocianinas.



Gráfica 1. Comparación en la extracción de antocianinas con diferentes disolventes en diferentes tiempos

Los tiempos de extracción reportados son variables ya que depende de muchos factores como el disolvente, temperatura, agitación, concentración del ácido, entre otros, sin embargo la extracción es de las más rápidas si se compara con otros métodos de extracción encontrados en la literatura que duran hasta 24 horas (Zhendong y Weiwei, 2010) (Cuevas *et al*, 2008) (Salinas *et al*, 2003).

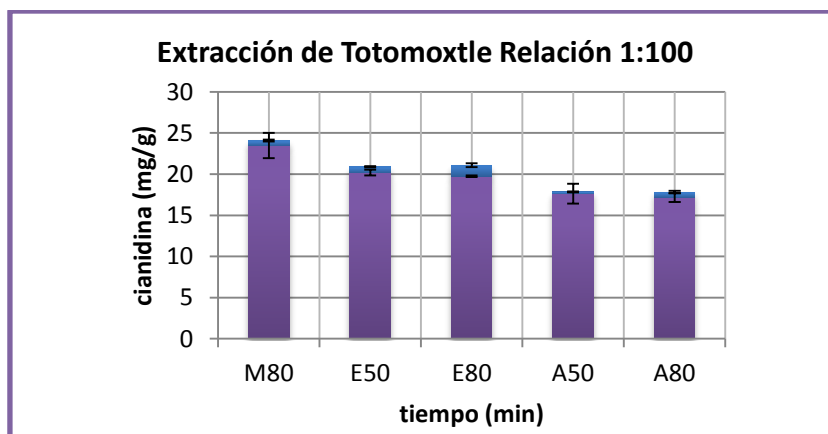
8.2.3. Relación soluto:disolvente S/D y número de extracciones

En la determinación de disolvente y tiempo de extracción se usó una relación S/D 1:200, asegurando la extracción máxima de antocianinas. En esta etapa se busca disminuir la cantidad de disolvente sin afectar el rendimiento de la extracción.

Se realizó la extracción de las antocianinas con una relación 1:100 y 1:50 probando todos los disolventes para confirmar que disolvente y relación S/D se utiliza en las etapas posteriores. Al usar la relación S/D de 1:100 la tendencia se conserva y se obtiene la máxima cantidad de antocianinas con el metanol, seguida del etanol al 80%, etanol al 50%, acetona al 50 y 80%, que extraen la misma cantidad de antocianinas, teniendo 24 mg_{cyd}/g con metanol hasta 18 mg_{cyd}/g con acetona al 80 y 50%.

Tabla 10. Concentración de antocianinas (mg/g) de diferentes disolventes usando una relación 1:100

Antocianinas Totales (mg/g) Relación 1:100				
M80	E50	E80	A50	A80
24.09± 1.66	20.88±0.44	21.10±0.33	17.85±1.26	17.85±0.67



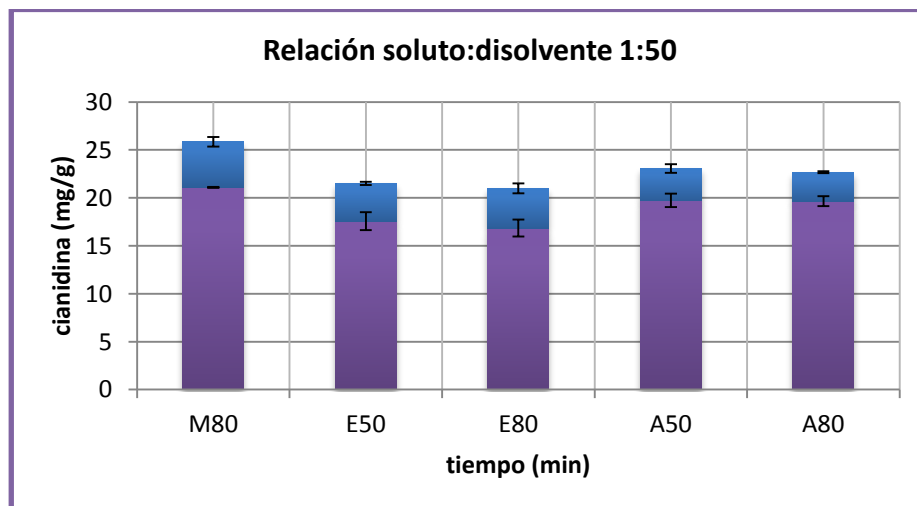
Gráfica 2. Comparación de la extracción de antocianinas totales con diferentes disolventes usando una relación S/D 1:100, la barra morada corresponde a la primera extracción y la barra azul corresponde a la segunda extracción.

Al disminuir la relación S/D a 1:50 se obtienen los datos mostrados en la tabla 11 donde la extracción con metanol da $26\text{mg}_{\text{cyd}}/\text{g}$ que no presenta diferencia significativa con respecto a la extracción con una relación S/D 1:100, en la extracción con etanol al 50 y 80% se presentan $21\text{mg}_{\text{cyd}}/\text{g}$ al igual que con la relación 1:100. Al usar acetona se nota un aumento en la cantidad de antocianinas, lo que puede ser resultado de una interacción de la acetona con las antocianinas formando las piranoantocianinas (Castañeda *et al*, 2008), por lo tanto cuando hay mayor cantidad de acetona esta reacción se favorece la cantidad de antocianinas extraídas es menor, mientras que al disminuir el volumen del disolvente esta reacción es menos cuantitativa lo que se ve reflejado en una mayor cantidad de antocianinas.

El disolvente más adecuado para la extracción de antocianinas de totomoxtle es el etanol al 80%, ya que en la figura 16 presentada en la página 47 se muestra claramente que hay una degradación del color cuando se usa como disolvente la acetona.

Tabla 11 Concentración de antocianinas (mg/g) de diferentes disolventes usando una relación 1:50

antocianinas totales (Relación 1:50)				
M80	E50	E80	A50	A80
25.85 ± 0.58	21.5 ± 1.10	21.01 ± 1.40	23.06 ± 1.16	22.67 ± 0.61



Gráfica 3 Comparación de la extracción de antocianinas totales con diferentes disolventes usando una relación S/D 1:50, la barra morada representa la primera extracción y la barra azul representa la segunda extracción.

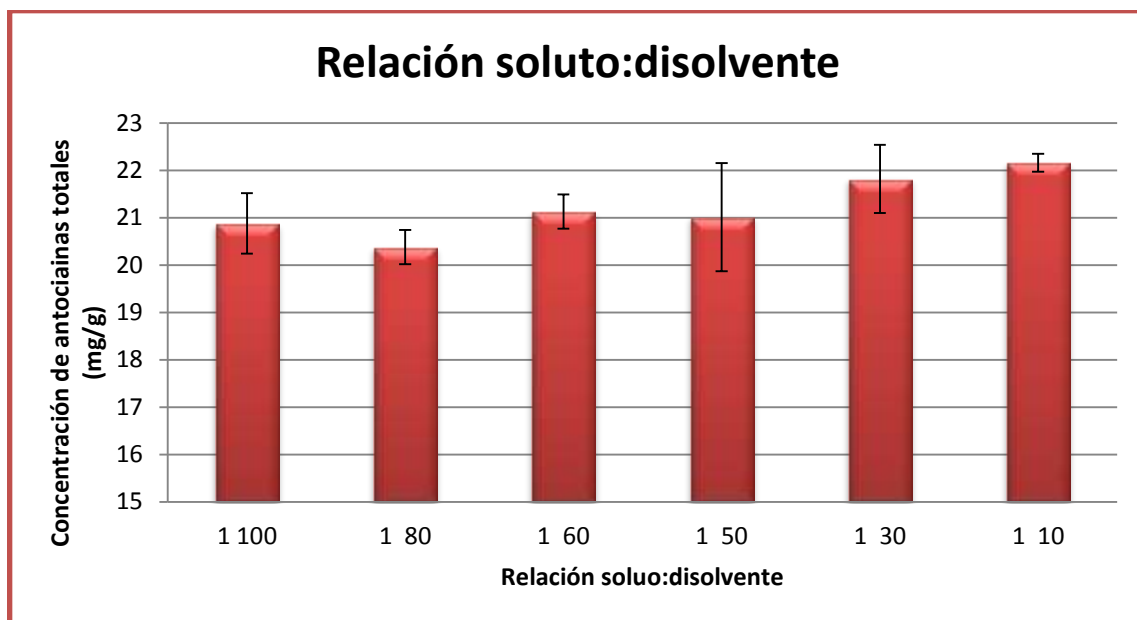
Teniendo el disolvente más adecuado para la extracción se hace un estudio más profundo en la relación S/D probando desde 1:100 hasta 1:10 obteniendo los resultados mostrados en la tabla 12 en cada una de estas pruebas se realizan dos extracciones para poder determinar la relación óptima de soluto:disolvente y el número de extracciones para tener una mayor extracción de antocianinas.

Al evaluar la primera extracción se muestra una disminución en la cantidad de antocianinas debido a que no se logran solubilizar todas las antocianinas presentes y disminuye el valor de 20 mg_{cyd}/g hasta 16 mg_{cyd}/g. Sin embargo los resultados totales de las dos extracciones muestran que la mayor cantidad de antocianinas se extraen con una relación de 1:50, 1:30 y 1:10, en este caso se tienen que evaluar los costos de disolvente y el tiempo de extracción para determinar si es más conveniente usar una extracción con una relación 1:100 o usar dos extracciones de 1:10, ya que al hacer dos extracciones implica un doble gasto de energía.

Tabla 12. Resultados de Antocianinas Totales de la primera y segunda extracción expresados en mg de cianidina/g

	1 100	1 80	1 60	1 50	1 30	1 10
Primera extracción	20.19±0.36	17.51±0.04	16.34±0.44	16.85±0.88	18.33±0.63	15.86±0.84
Segunda extracción	0.69 ±0.08	2.87±0.12	3.79±0.19	4.16±0.52	3.49±0.09	6.3±0.05
Antocianinas totales	20.88±0.44	20.38±0.16	20.13±0.63	21.01±1.40	21.82±0.72	22.16±0.89

Tomando en cuenta la primera extracción se obtiene que la mejor relación S/D es 1:100 ya que la relación 1:80 presenta una pérdida del 13% de antocianinas y la relación 1:10 solo extrae el 78% (15.9 mg_{cyd}/g) lo que representa una pérdida del 22%. Pero al realizar la segunda extracción la mejor opción es la relación 1:10 ya que aumenta un 6% la extracción de antocianinas y disminuye 5 veces el volumen de disolvente comparándolo con la extracción simple usando una relación 1:100. El inconveniente sería a nivel industrial para el tiempo invertido, ya que la extracción dura el doble de tiempo y también hay que considerar el gasto de energía.



Gráfica 4. Antocianinas Extraídas usando diferentes relaciones S/D, los resultados mostrados son la suma de dos extracciones

Con respecto a datos encontrados en la literatura, los resultados obtenidos están dentro del rango ya que se han reportado relación S/D desde 1:100 hasta 1:4 variando los tiempos de extracción y el número de extracciones (Jing y Giusti, 2005) (Zhendong y Weiwei, 2010).

8.2.4. Ácidos

El ácido usado en la extracción es fundamental para la obtención de las antocianinas ya que a pH bajos están ionizadas y las interacciones con el disolvente aumentan, además de tener una mayor estabilidad al presentarse como ión flavilio. Entre más bajo esté el pH la estabilidad de las antocianinas aumenta, y el pH óptimo de extracción es de 1. Este pH se logra con ácidos fuertes, como el ácido clorhídrico o sulfúrico, sin embargo, en la industria de alimentos este tipo de ácidos están prohibidos debido a su toxicidad, por lo que se deben usar ácidos orgánicos como el ácido láctico, tartárico, málico, ferúlico, succínico, cítrico, etc. Con base en la literatura se seleccionaron cuatro ácidos para la extracción tomando como referencia el ácido acético ya que es el ácido orgánico más común utilizado en la extracción de antocianinas. Los ácidos utilizados son: cítrico, láctico, ferúlico y tartárico todos al 1%, presentando un pH distinto, en el cual el que presenta una menor pH es el ácido tartárico, seguido del ácido láctico, acético cítrico y al final el cítrico, los resultados van de 2.99-3.97.

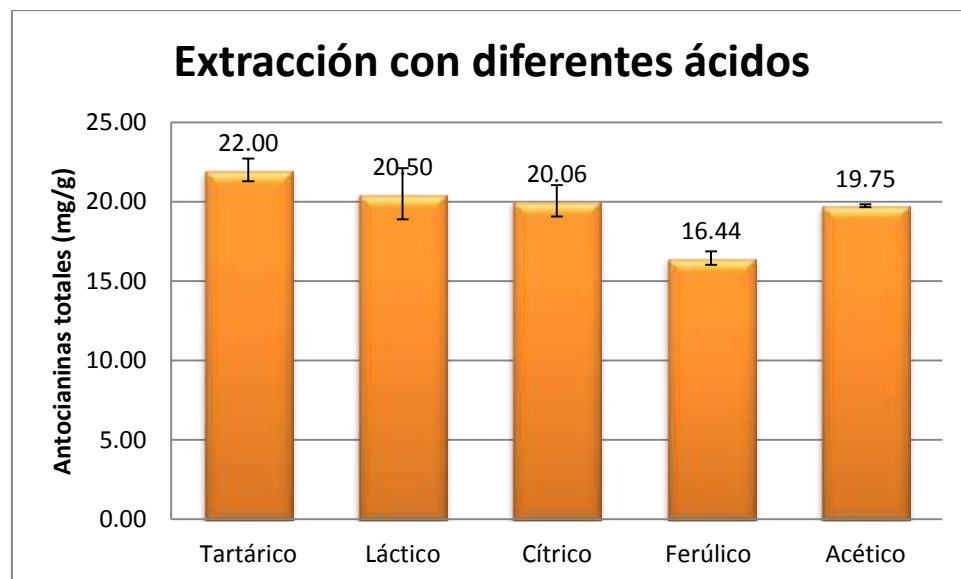
Tabla 13. El pH fue medido en etanol al 80%

Ácido utilizado al 1%	pH
Tartárico	2.99
Láctico	3.62
Cítrico	3.67
Ferúlico	3.97
Acético	3.63

Los resultados (gráfica 5) muestran que la extracción usando ácido tartárico como acidulante es la mejor, ya que extrae alrededor del 7% más antocianinas ($22\text{mg}_{\text{cyd}}/\text{g}$) que el láctico, cítrico y acético ($\sim 20\text{mg}_{\text{cyd}}/\text{g}$), y el ácido ferúlico es el que presenta la menor extracción, ya que sólo se extrae el 82% de las antocianinas en comparación con el ácido tartárico. Al realizar el análisis estadístico se demostró que la extracción con ácido láctico, cítrico y acético son similares, pero que la extracción con ácido tartárico y ferúlico si presentan una diferencia.

La variación en la extracción de antocianinas se debe principalmente a la fuerza que tiene cada uno de estos ácidos, la tendencia de extracción es la misma que la variación del pH, así el que tiene un menor pH extrae una mayor cantidad de antocianinas en este caso el ácido tartárico, y el que presenta un mayor pH extrae menor cantidad de antocianinas siendo el ácido ferúlico ya que presenta un pH de 3.97 en el cual las antocianinas empiezan a ser más susceptibles al ataque nucleofílico por parte del agua, produciéndose la pseudobase y, posteriormente, da lugar a la chalcona, la cual es incolora. Este fenómeno se da a pH de 4.5 (Cuevas, 2008) y el efecto no es reversible por lo que se observa una disminución en la cantidad de antocianinas.

En los artículos revisados se realiza la extracción de antocianinas a pH menores de 3.5 con lo cual logran sus mejores resultados, Hurtado y colaboradores muestran el efecto que tiene el pH en el color de las antocianinas manteniéndose un color estable entre pH 2 y 3.4 y a partir de 3.5-6.5 el color disminuye considerablemente hasta en un 70% (Hurtado *et al*, 2009), por lo cual se concluye que el ácido ferúlico no es conveniente para la extracción ya que no alcanza el pH menor a 3.5 al usarse al 1%.



Gráfica 5. Extracción de antocianinas en 30 min, frente a diferentes ácidos usando etanol al 80%

En la siguiente etapa del proyecto se aplicarán las mismas condiciones para la extracción de antocianinas en el olote.

- ✦ Disolvente: etanol al 80%
- ✦ Tiempo de extracción: 30 min
- ✦ Relación soluto/disolvente: 1:10
- ✦ Número de Extracciones: 2
- ✦ Ácido: Tartárico 1%.

ETAPA 3

8.3. Métodos de Extracción.

Cada método de extracción presenta variables las cuales pueden mejorar la extracción, en la sección anterior se fijaron las condiciones de extracción de disolvente, relación S/D y ácido. Por lo cual en esta etapa se realizaron dos extracciones usando como disolvente etanol 80%, una relación S/D de 1/10, con 1% de ácido tartárico, para poder encontrar el mejor método de extracción de antocianinas (Maceración, Sonicación, Microondas y Enzimático).

8.3.1. Maceración

Los resultados obtenidos tabla 15 muestran que el totomoxtle presenta 21.67 ± 0.85 mg_{cyd}/g con el tratamiento de metanol. En un estudio realizado por Chun-Ying Li y colaboradores en el 2008 se evaluó el contenido de antocianinas en el totomoxtle de 10 maíces morados obteniendo valores de 132-13 mg_{cyd}/g (Chun-Ying *et al*, 2008). Los datos obtenidos son congruentes con los datos reportados. Para el olote (tabla 14) se han reportado valores desde 16.40-2.60 mg/g (Salinas, 2008) (Jing, 2006), en este caso los valores encontrados fueron menores a los determinados en este trabajo, esto puede deberse a la diferencia del tratamiento de la muestra, ya que se desconoce la metodología empleada para la preparación de la muestra.

Los resultados muestran que el olote tiene un 8% más cantidad de antocianinas que el totomoxtle, esto puede ser debido a que el material del olote es más suave lo cual facilita la extracción de antocianinas, ya que el totomoxtle presenta una estructura más dura.

Los datos obtenidos serán usados como punto de comparación para los otros métodos de extracción (sonicación y microondas), ya que este tipo de extracción es usado comúnmente en la obtención de antocianinas (Øyvind y Kenneth, 2006).

Tabla 14. Antocianinas extraídas del olote, en la primera y segunda extracción.

Antocianinas Totales mg/g		
1° Extracción	2° Extracción	TOTAL
17.35	5.97	23.32
20.32	4.96	25.29
18.14	4.91	23.04
	PROMEDIO	23.88
	D.S.	1.23

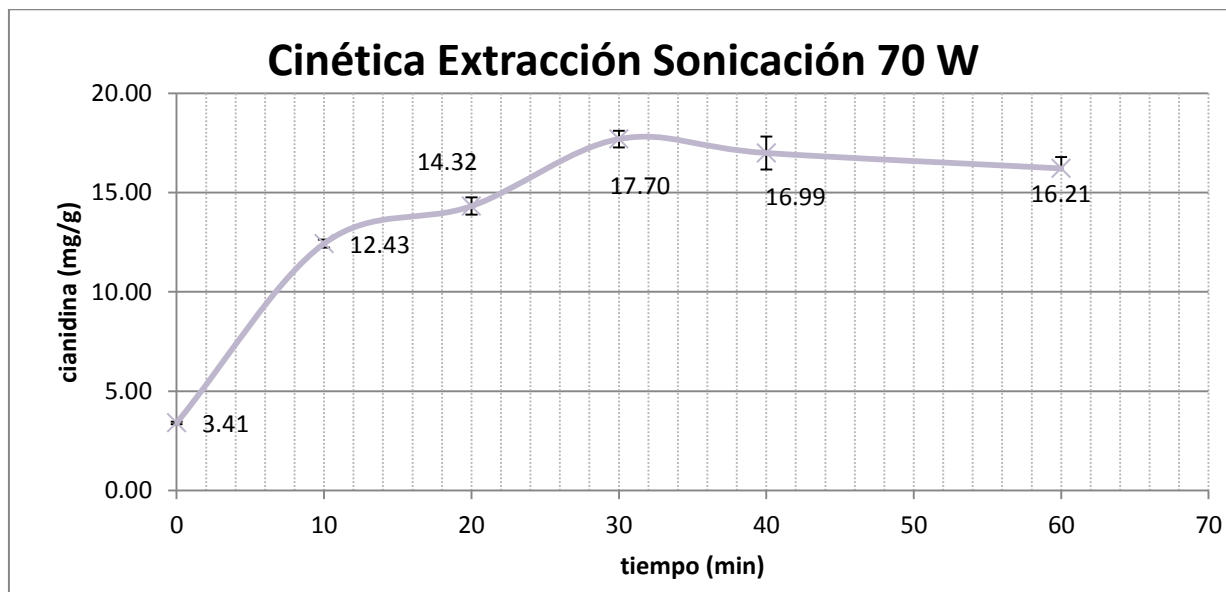
Tabla 15. Antocianinas extraídas del totomoxtle, en la primera y segunda extracción

Antocianinas Totales mg/g		
1° Extracción	2° Extracción	TOTAL
15.57	6.26	21.82
15.46	6.27	21.73
15.62	6.49	22.12
	PROMEDIO	21.89
	D.S.	0.20

8.3.2. Sonicación

Para el método de sonicación se debe determinar la potencia de sonicador y el tiempo de extracción.

En la gráfica 6 se muestran la cinética de extracción de antocianinas del totomoxtle usando diferente potencia en la extracción. En la extracción que se usó la potencia de 70W el máximo tiempo de extracción fue de 30 min después del cual se mantiene la cantidad de antocianinas, mientras que en la extracción que se usó 100 W de potencia (gráfica 7) se disminuyó el tiempo de extracción a 20 min lo que representa una disminución del 44% en el tiempo de extracción, además de aumenta la cantidad de antocianinas totales en la primera extracción, ya que en la extracción con 70W se obtuvo una extracción máxima de antocianinas de 17.70 mg/g, mientras que con la extracción con 100W se obtuvieron 20.84 mg/g lo que representa un 15% más la extracción de antocianinas.

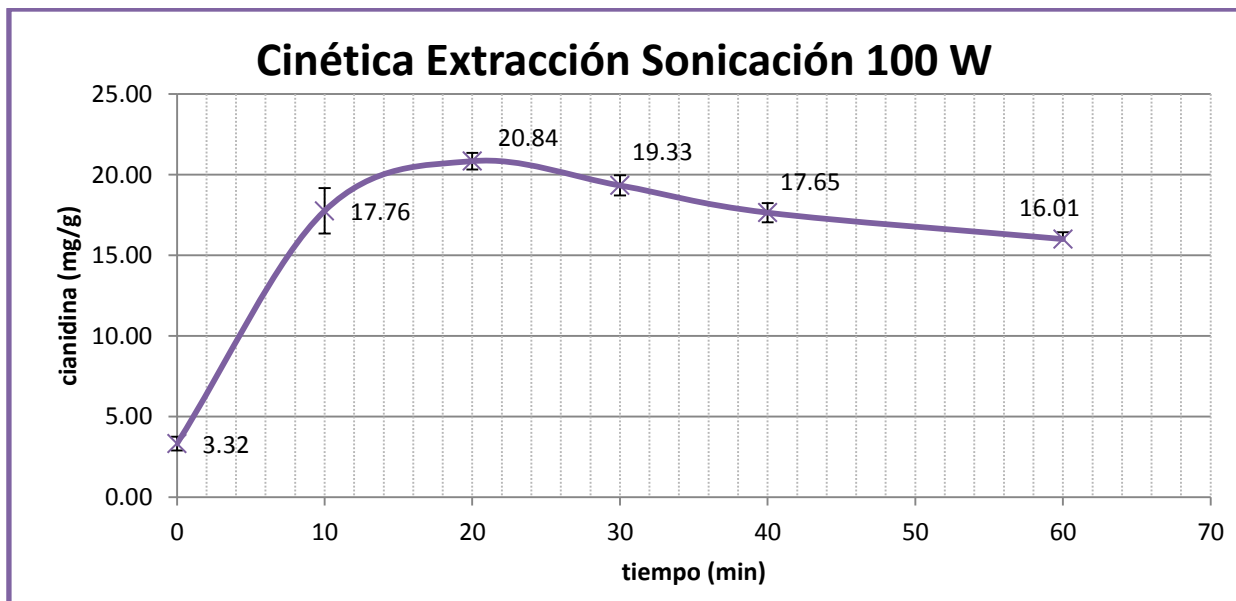


Gráfica 6. Evaluación del tiempo de extracción de antocianinas del totomoxtle usando un sonicador de 70 W de potencia y 42 KHz

Es importante tomar en cuenta el tiempo de extracción ya que a parte de mostrar un ahorro energético, si se excede este tiempo de extracción la eficiencia puede disminuir en un 2.9% ya que como se ve en la gráfica 6, conforme aumenta el tiempo de extracción la cantidad de antocianinas disminuye este fenómeno se aprecia de una mejor manera en la cinética de extracción usando una potencia de 100W mostrado en la gráfica 7 ya que al aumentar la

potencia se genera una mayor número de burbujas de cavitación, las cuales al implotar liberan una cantidad de energía que se ve reflejada en un aumento en la temperatura, ocasionando la degradación de las antocianinas, aunque no es significativo esta disminución si se puede ahorrar tiempo en la extracción,

Durante la cinética de extracción se siguió la variación de la temperatura, que fue para la extracción a 70W la temperatura inicial de 24°C y la final de 41°C, mientras que en la extracción a 100W la temperatura inicial fue de 24°C y la final de 45°C. El aumento de temperatura fue similar sin embargo en la extracción a 100W se llegó a esta temperatura más rápidamente que en la extracción a 70 W.



Gráfica 7. Evaluación del tiempo de extracción de antocianinas del totomoxtle usando un sonicador de 100 W de potencia y 42 KHz

Debido a que ya se determinó que la extracción máxima de antocianinas con las condiciones utilizadas se hace por medio de dos extracciones, se realizó la extracción del totomoxtle y del olote usando el tiempo óptimo de extracción determinado anteriormente y conservando las condiciones de relación soluto:disolvente, disolvente, ácido utilizado y número de extracciones. Se obtuvieron los resultados mostrados en las tablas 16 y 17, donde se observa que tanto para el olote como para el totomoxtle la extracción de antocianinas se aumentó un 12% y 18%, respectivamente, al usarse una potencia de 100W.

La sonicación se ha usado para la extracción de antocianinas de la mora azul, en el cual el tiempo de extracción usado es de 5-10 min. El uso de ultrasonido ayuda a la estabilización del extracto (Tiwari *et al*, 2009).

El tiempo óptimo de extracción encontrado fue de 20 minutos a comparación al reportado de 10 min, esto es debido a que la potencia del sonicador usado en los otros estudios es de 1500W, lo que equivale a 15 veces más la sonicación que se usó en este proyecto.

Tabla 17. Resultados de la primera y segunda extracción de antocianinas del olote, así como el total de antocianinas usando una potencia de 70 W (a) y 100 W (b)

a)

Antocianinas Totales mg/g (olote 70W)		
1° Extracción	2° Extracción	TOTAL
14.77	6.11	20.89
17.54	6.17	23.71
15.52	5.18	20.70
	PROMEDIO	21.76
	D.S.	1.69

b)

Antocianinas Totales mg/g (Olote 100W)		
1° Extracción	2° Extracción	TOTAL
19.35	4.89	24.24
20.24	4.42	24.66
20.53	3.50	24.03
	PROMEDIO	24.31
	D.S.	0.32

Tabla 16. . Resultados de la primera y segunda extracción de antocianinas del totomoxtle, así como el total de antocianinas usando una potencia de 70 W (a) y 100 W (b)

a)

Antocianinas Totales mg/g (Totomoxtle 70 W)		
1° Extracción	2° Extracción	TOTAL
15.24	6.32	21.55
15.87	6.16	22.03
16.13	5.93	22.06
	PROMEDIO	21.88
	D.S.	0.28

b)

Antocianinas Totales mg/g (Totomoxtle 100w)		
1° Extracción	2° Extracción	TOTAL
21.18	5.29	26.47
21.11	4.87	25.89
20.24	5.06	25.03
	PROMEDIO	25.80
	D.S.	0.59

8.3.3. Microondas

En este método se usó un equipo de microondas comercial en el cual se evaluaron 3 tiempos de extracción (30, 60 y 180 segundos). Los resultados se muestran en las tablas 18,19 y 20, donde se muestra que en a los 30 segundos se obtienen 16.82 mg_{cyd}/g mientras que al minuto se obtienen 24.4 mg_{cyd}/g lo que representa un aumento del 30%, sin embargo, al aumentar el tiempo de exposición a 3 minutos se obtienen 20.27 mg_{cyd}/g lo que representa una disminución. Esto puede deberse a que el aumento de temperatura fue más prolongado, lo cual ocasionó una degradación de las antocianinas.

Tabla 18 Resultados de la extracción de antocianinas del totomoxtle usando microondas durante 30 segundos

Antocianinas Totales mg/g (Totomoxtle 30 seg)		
1° Extracción	2° Extracción	TOTAL
15.07	2.50	17.56
12.86	2.62	15.48
15.08	2.34	17.42
	PROMEDIO	16.82
	D.S.	1.16

Tabla 19 Resultados de la extracción de antocianinas del totomoxtle usando microondas durante 1 minuto

Antocianinas Totales mg/g (1 min)		
1° Extracción	2° Extracción	TOTAL
18.15	5.60	23.75
18.65	6.75	25.40
18.15	6.11	24.26
	PROMEDIO	24.47
	D.S.	0.85

Tabla 20. Resultados de la extracción de antocianinas del totomoxtle usando microondas durante 3 minutos

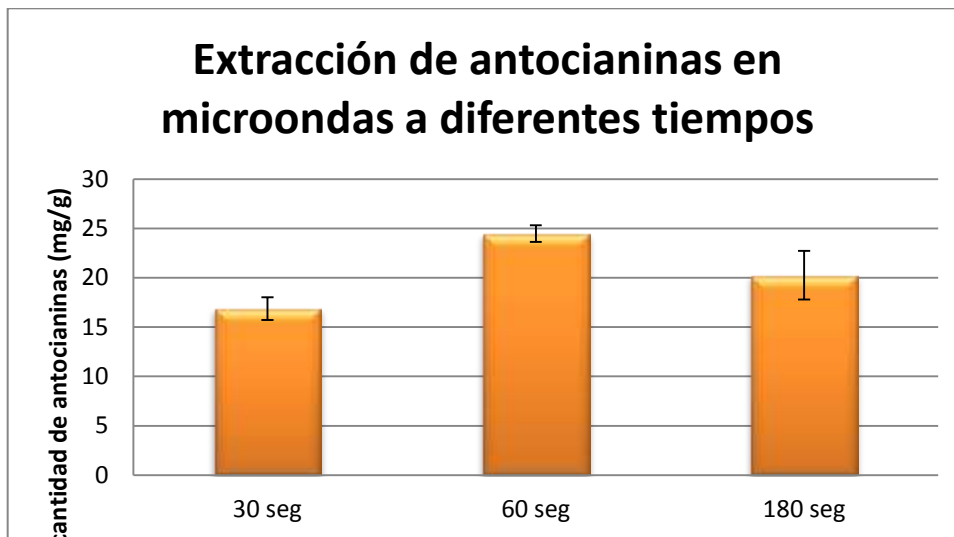
Antocianinas Totales mg/g (3 min)		
1° Extracción	2° Extracción	TOTAL
18.03	5.00	23.03
14.84	4.67	19.51
13.64	4.63	18.27
	PROMEDIO	20.27
	D.S.	2.47

En el caso del olote se obtuvieron 19.11 mg_{cyd}/g. Estos resultados nos permiten evaluar el potencial que tiene la extracción con microondas ya que se logra la extracción del 80% de las antocianinas en 30 segundos, en comparación con el método de maceración en donde el tiempo de extracción fue de 30 minutos, o el de sonicación, que fue de 20 minutos. Se han realizado diversos estudios para la extracción de compuestos bioactivos usando microondas en los cuales se logra incrementar el rendimiento y reducir los tiempos de

extracción de como en el caso de algunos alcaloides y en el caso de camote donde se usó la extracción asistida por microondas para la obtención de polifenoles (Zhang *et al*, 2011).

Tabla 21. Resultados de la extracción de antocianinas del olote usando microondas durante 30 segundos.

Antocianinas Totales mg/g OLOTE (30 seg)		
1° Extracción	2° Extracción	TOTAL
12.33	6.07	18.39
15.56	6.19	21.75
13.99	5.18	19.17
	PROMEDIO	19.77
	D.S.	1.76



Gráfica 8 Extracción de antocianinas del totomoxtle usando diferentes tiempos de extracción

El mejor tiempo de extracción fue al minuto, lo que es similar a estudios realizados para la extracción de antocianinas de las fresas, en donde se expusieron las fresas a 60 segundos en el microondas (Puri *et al*, 2012).

A pesar que los resultados obtenidos presentan una gran ventaja en reducción en tiempo, es necesario tomar en cuenta la limitante que se presenta al involucrar microondas a nivel industrial, ya que al hacer un escalamiento no se logra obtener los mismos resultados pues se presentan problemas de absorción y las microondas presentan una limitada penetración lo cual limita el proceso a hacerlo por lotes donde la capacidad máxima es de 12 litros aproximadamente (Hoz *et al*, 2011).

8.3.4. Enzimático

En los métodos de extracción anteriores (maceración, sonicación y microondas) el residuo obtenido aún presenta una coloración morada. Por este motivo, se decidió trabajar con este material y someterlo a un tratamiento enzimático para evaluar si se logra una mayor extracción de antocianinas.



Figura 17 Residuo obtenido después de la extracción por sonicación

8.3.4.1. Enzima a utilizar

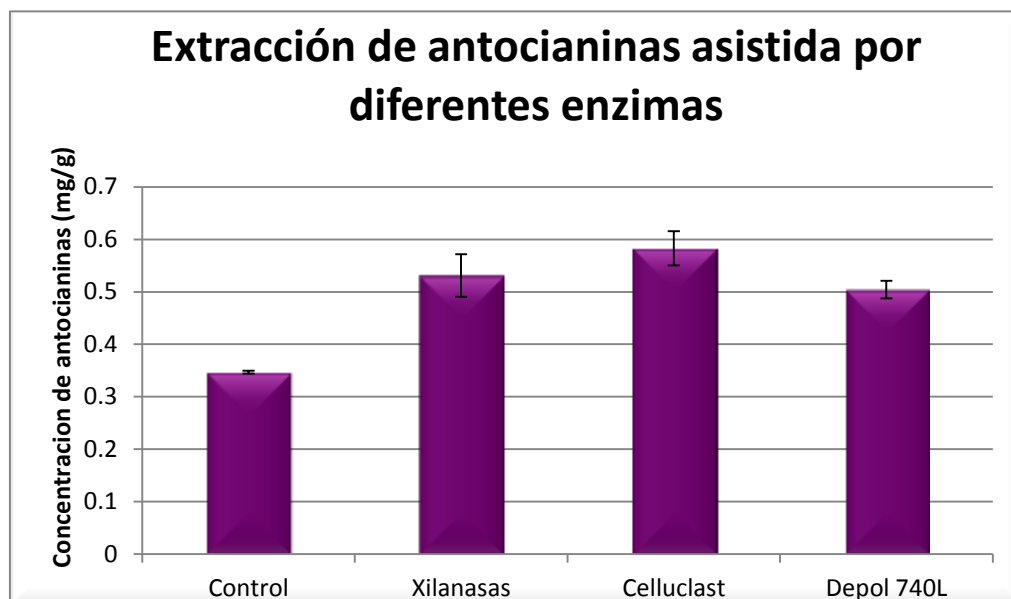
Los resultados obtenidos muestran que en comparación con el control, que es el tratamiento sin enzima, se obtiene un aumento del 53%, para la Celluclast un 68% y para la Depol 740L un 45%. Estos resultados representan 2.4%, 2.7% y 2.3% del total de antocianinas obtenido en la extracción con maceración, con las condiciones iniciales de extracción enzimática. De acuerdo a la actividad de cada enzima los resultados no fueron los esperados ya que las xilanasas presentan una mayor actividad que la Celluclast, sin embargo hubo un mayor rendimiento en la extracción con la enzima Celluclast, esto se puede explicar al tipo de enzimas que tiene cada coctel, posiblemente hay una inhibición por producto mayor en las xilanasas que en la Celluclast 1.5L. Otro factor muy importante que hay que tomar en cuenta es la metodología usada ya que la enzima se adicionaron en porcentaje volumen/peso por lo que se tomaron 50 μ L para 0.5g de muestra, tomando en cuenta la densidad de las enzimas, la Celluclast 1.5L tiene una densidad de 1.22 g/ml menor a las xilanasas por lo que adicionó mayor cantidad de enzima, probablemente por eso no se obtuvieron los resultados esperados.

La Depol740L presenta el menor rendimiento en comparación con las xilanasas y la Celluclast 1.5L, esto es debido a que la actividad que presenta es de 36 U/g contra las xilanasas de 1170 U/g y la Celluclast de 700 U/g (tabla 22) además de que el coctel enzimático no presenta el mismo perfil de enzimas, ya que la Celluclast presenta una mayor cantidad de celulasas, mientras que la Depol740 presenta una mayor actividad de feruloilesterasas, lo que significa que hidroliza el enlace éster del entre los ácido hidroxicinámicos y los polisacáridos de la pared celular, lo cual ayuda a aumentar la

permeabilidad, sin embargo, el uso de celulasas actúa directamente en la estructura de la pared celular por lo cual la permeabilidad es mayor.

Tabla 22. Condiciones óptimas de uso para cada una de las enzimas utilizadas

.	Xilanasas	Celluclast	Depol 740L
pH	5	4.5-6	4-6
Temperatura óptima (°C)		50	40-60
Actividad principal (U/g)	1170	700	36
	Xilanasas y pectinasas	Celulasas	Feruloilesterasas



Gráfica 9 Comparación de la extracción de antocianinas usando diferentes enzimas

Debido a que las xilanasas usadas son enzimas *nuevas* se decidió optimizar su uso en la extracción de antocianinas en el residuo del totomoxtle, al mismo tiempo que se hace la extracción con Celluclast para hacer una comparación con las enzimas ya usadas comercialmente.

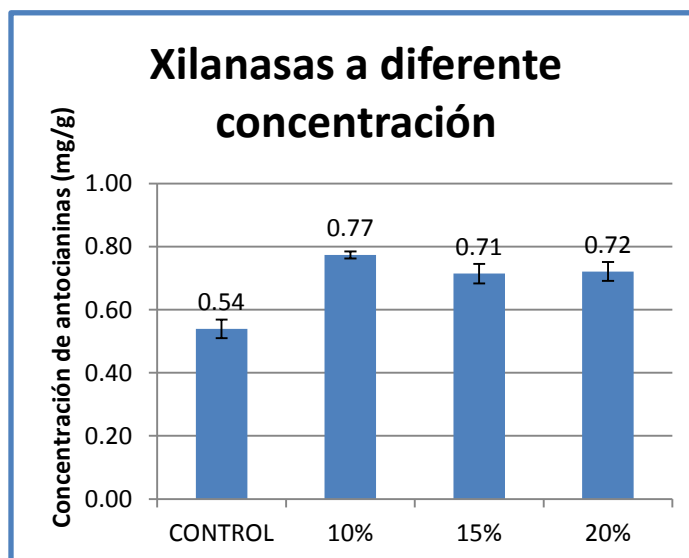
8.3.4.2. Concentración

Se evaluó la concentración de enzima óptima (tabla 24) obteniéndose que con el 10% de enzima es suficiente para obtener la máxima extracción, ya que con el 15% y el 20% se obtienen similares resultados, ya que el análisis estadístico no muestra diferencia significativa entre las tres concentraciones. Se obtuvieron 0.77 mg_{cyd}/g mientras que en el control se logró extraer 0.54 mg_{cyd}/g lo que representa que la enzima logró un aumento del 42%.

Tabla 23. Antocianinas extraídas enzimáticamente usando Xilanasas a diferentes concentraciones.

	CONTROL	10%	15%	20%
1	0.57	0.78	0.75	0.74
1D	0.54	0.78	0.71	0.69
1T	0.51	0.76	0.68	0.74
PROMEDIO	0.54	0.77	0.71	0.72
D.S.	0.03	0.01	0.03	0.03

Seguramente es posible disminuir la cantidad de enzima, ya que los procesos industriales en los que ya se lleva a cabo la extracción de compuestos bioactivos usan concentraciones de enzima del 0.05% y 0.1% p/p.



Gráfica 10 Efecto de la concentración en la extracción de antocianinas

8.3.4.3. pH

Debido a que las enzimas tienen un pH óptimo entre 4 y 6, y las antocianinas son más estables a pH 3, se evaluó el impacto en la extracción al variar el pH de 5 a 3. Los resultados muestran (tabla 25 y 26) que la mejor extracción es a pH 5 ya que las enzimas están a un pH óptimo, de acuerdo a las especificaciones proporcionadas por los proveedores, y logran degradar satisfactoriamente la red de lignina y celulosa que compone la pared celular del totomoxtle y se logra obtener un 60% más en el rendimiento de antocianinas en comparación con la extracción a pH de 3 a pesar de que el pH no favorece la estabilidad de las antocianinas.

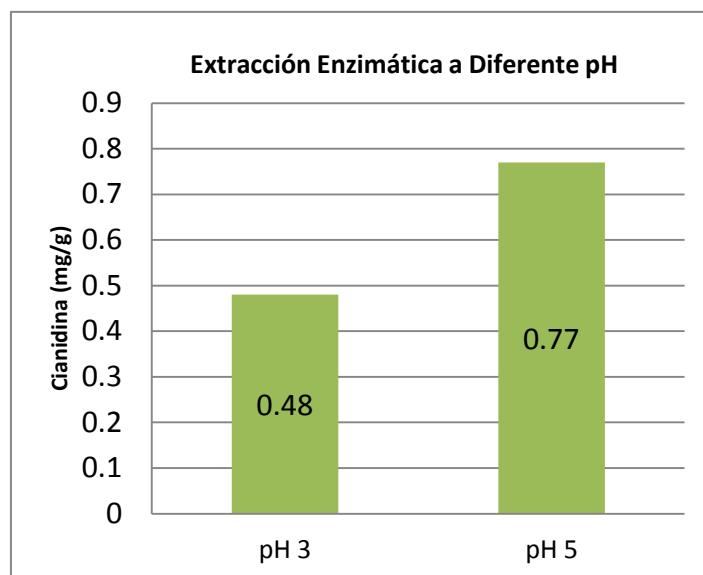
Tabla 24. Antocianinas totales extraídas vía enzimática con xylanasas a pH 5

ANTOCIANINAS TOTALES (mg cyd/g residuo)				
CONTROL	10%	15%	20%	
0.54±0.03	0.77±0.01	0.71±0.03	0.72±0.03	

Tabla 25. Antocianinas extraídas vía enzimática con xylanasas a pH 3

ANTOCIANINAS TOTALES (mg cyd/g residuo)				
CONTROL	10%	15%	20%	
0.38±0.01	0.48±0.01	0.48±0.01	0.42±0.01	

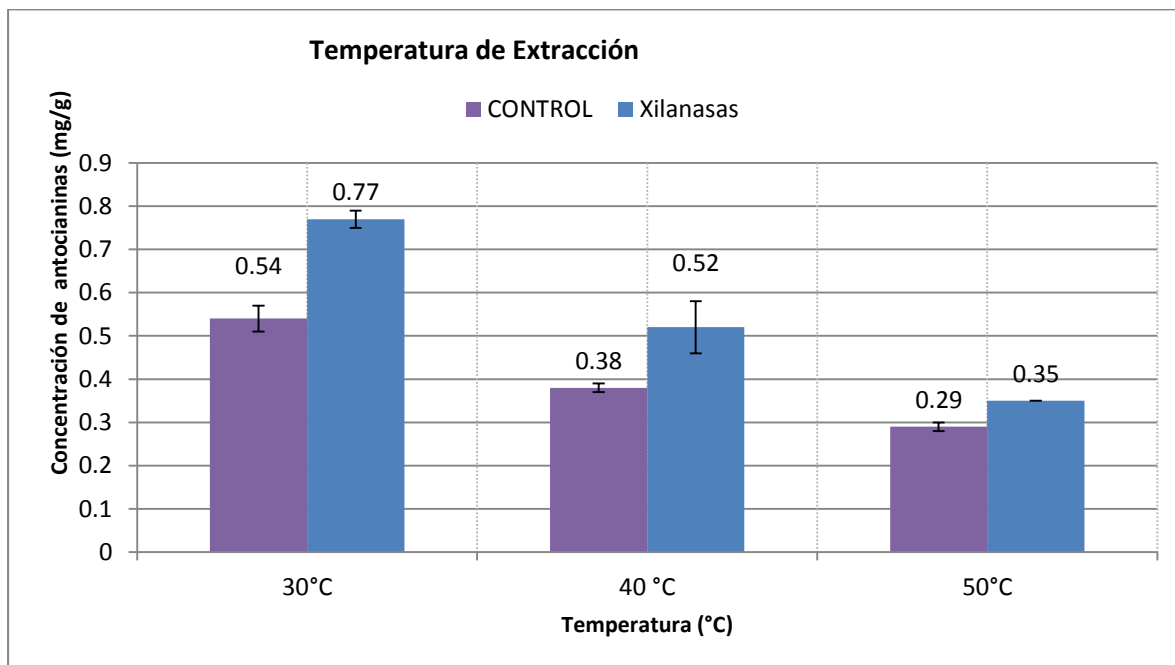
No se ha reportado el uso de enzimas para la extracción de antocianinas de maíz, pero para la extracción de luteína se usan preparados enzimáticos cuyo pH están alrededor de 4.8 (Chacón y Waliszewski, 2005), lo que concuerda con los resultados obtenidos, ya que dentro de las enzimas que usan están las celulasas.



Gráfica 11. Efecto del pH en la extracción de antocianinas

8.3.4.4. Temperatura

Se evaluó la extracción a tres diferentes temperaturas las cuales fueron 30°C, 40°C Y 50°C ya que la actividad óptima de las enzimas es de 50-60°C, pero al igual que lo ocurrido con el pH estas condiciones no coinciden con la estabilidad de las antocianinas.



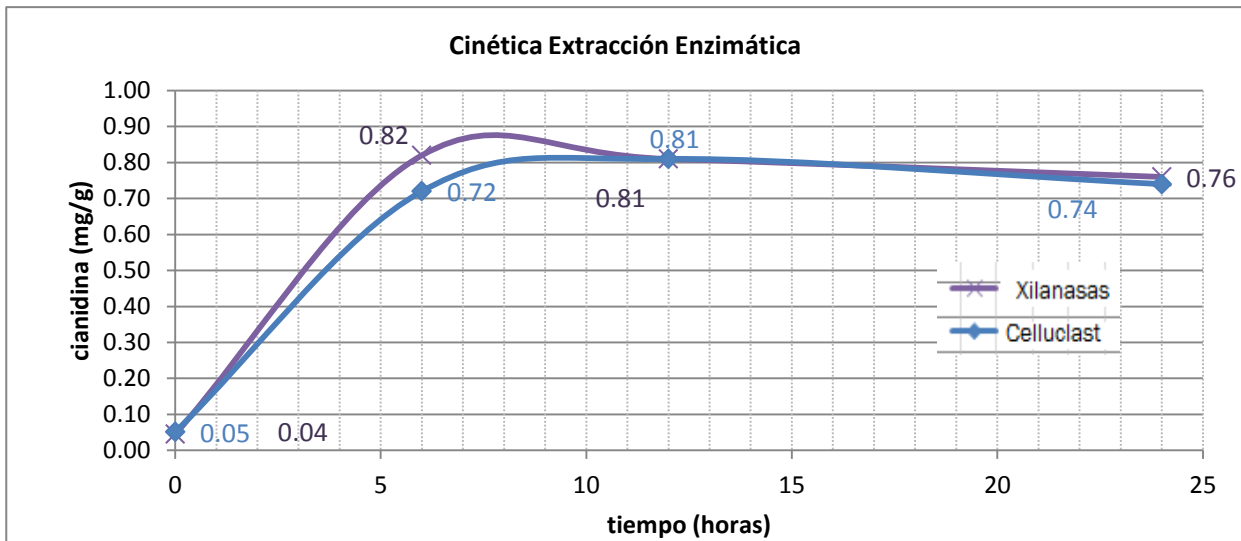
Gráfica 12. Efecto de la temperatura en la extracción de antocianinas

Los resultados se muestran en la gráfica 12 donde se observa que las antocianinas se degradan rápidamente al aumentar la temperatura. Por lo tanto la temperatura óptima de extracción con enzimas es 30°C, ya que al aumentar la temperatura a 40°C se obtiene una disminución del 32% en la extracción. Cuando se utilizó una temperatura de 50°C la disminución fue del 55%, esto también puede ser por el tiempo que estuvieron expuestas a esa temperatura que fueron 24 horas.

8.3.4.5. Tiempo de extracción

Tomando en cuenta los parámetros evaluados anteriormente se realizó la cinética de extracción mostrando que el tiempo máximo de extracción ocurre en las primeras 6 horas lo cual reduce 4 veces el tiempo inicial que era de 24 horas en el caso de las xilanasas, mientras que en la cinética de extracción donde se usó la enzima Celluclast el tiempo

máximo de extracción fue a las 12 horas. Esto se puede deber a la diferencia en las actividades enzimáticas de cada enzima ya que las xilanasas (1170 U/g) contiene un 40% más de actividad enzimática que la Celluclast (700 U/g), sin embargo no se especifican cual es la proporción de celulasas, hemicelulasas y feruloilesterasas que hay en cada coctel de enzimas, lo que también influye en la velocidad de reacción enzimática.



En comparación con los datos obtenidos en las primeras condiciones de 24 horas, temperatura ambiente y pH 3 se mejoró la extracción en un 30%. Y tomando en cuenta el método de maceración como referencia se obtiene un 3.7% más en la extracción de antocianinas con el uso de xilanasas como con el uso de Celluclast, la diferencia entre estas dos enzimas radica en el tiempo de extracción ya que la Celluclast presenta una máxima extracción a las 12 horas mientras que las xilanasas tienen un tiempo máximo de extracción de 6 horas. La velocidad en la que actúa una enzima depende de su actividad enzimática por lo que los datos obtenidos concuerdan con los esperados ya que las xilanasas tienen una actividad de 1170U/g mientras que la Celluclast presenta una actividad de 700 U/g.

No se encontraron estudios del uso de enzimas en la extracción de antocianinas en maíz pero si en la extracción de antocianinas a partir de las uvas, el cual ya es un proceso industrializado en donde la temperatura óptima es de 40°C, que es mayor a la determinada en este estudio, que fue de 30°C. Una de las razones por la cual en el proceso de la uva se puede usar una temperatura más alta es por que el tiempo de extracción es de 2 horas. El

pH usado en la extracción a partir de las uvas es de 4, el cual no se evaluó en este proyecto y en estas condiciones se logra mejorar el rendimiento en 63.6% con respecto al proceso sin enzimas (Maier *et al*, 2008).

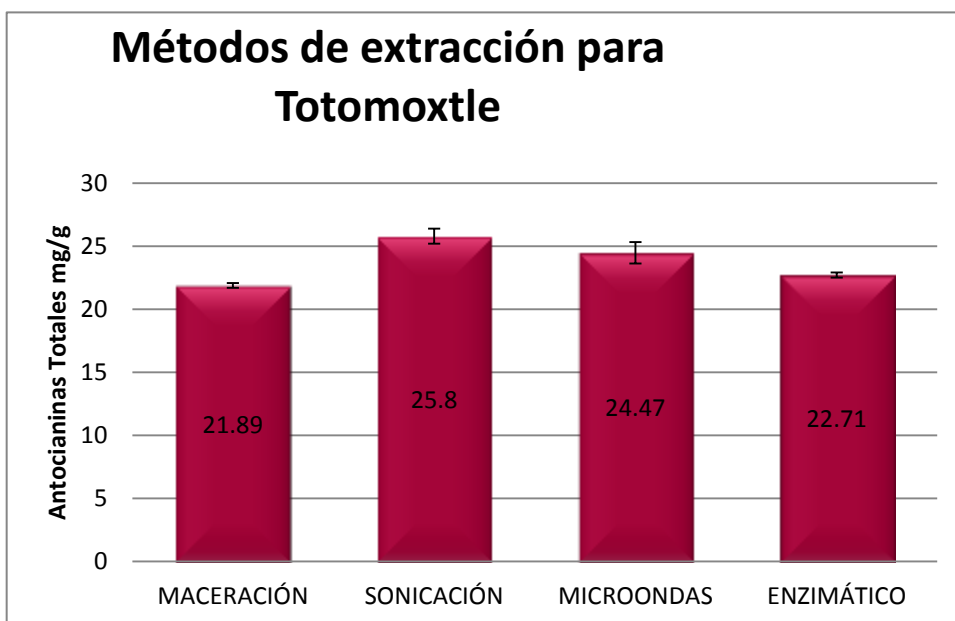
8.3.5. Comparación de métodos no convencionales

En la gráfica 13 se muestran los resultados de cada método de extracción para la obtención de antocianinas a partir del totomoxtle. Se aprecia que el método que extrae la mayor cantidad de antocianinas es método de sonicación, lo que disminuye además el tiempo de extracción a 20 minutos en comparación con el método de maceración.

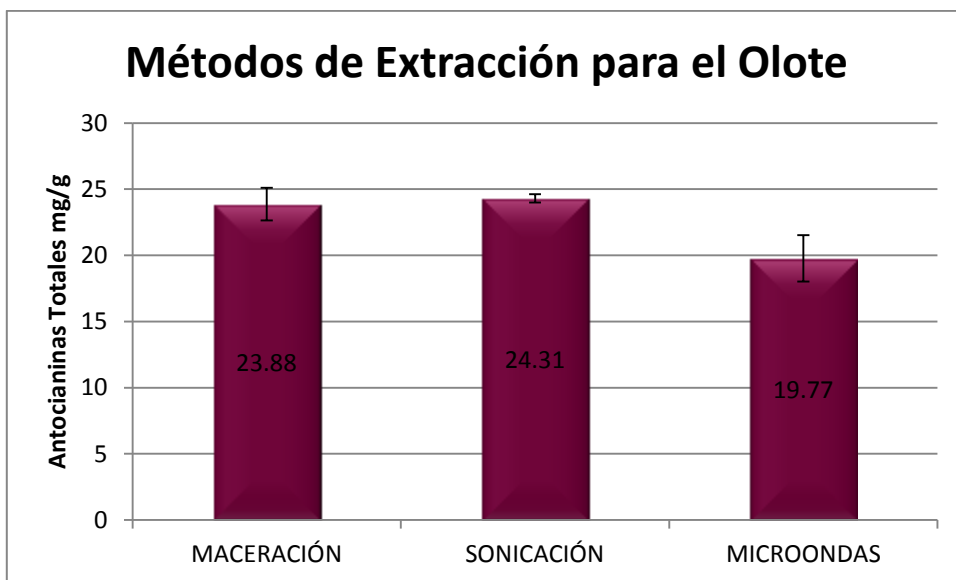
El tratamiento con microondas mostro resultados también mayores en un 12 % al método de maceración, sin embargo, la desventaja a nivel industrial es el uso de un microondas ya que no hay equipos tan grandes para poder usarlos para la extracción.

El método enzimático es una opción para aumentar el rendimiento de las antocianinas, ya que en este trabajo se trabajo con el residuo de la extracción con maceración para asegurar el ataque enzimático, sin embargo es importante evaluar el costo-beneficio del uso de enzimas, además del uso de tecnologías complementarias ya que se ha usado la extracción asistida con enzimas en conjunto con la sonicación (Banga *et al*, 2003).

Por lo tanto el mejor método de extracción de acuerdo a la mayor cantidad de antocianinas obtenidas es la sonicación, sin embargo, presenta un inconveniente a nivel industrial ya que los equipos a gran escala son costosos, mientras que el uso de maceración es el más barato, sin embargo, es necesario hacer la evaluación de costos para saber si es conveniente invertir en la sonicación y obtener un 17 % más de antocianinas, ya que estas son un producto de alto valor agregado con un precio en el mercado de alrededor de 2 500 a 4 100 pesos por kilogramo de extracto de antocianinas al 25% y tan solo se necesitan 40 kg de totomoxtle para obtener esta cantidad de antocianinas.



Gráfica 13 Comparación de los métodos de extracción a partir del totomoxtle



Gráfica 14 Comparación de los métodos de extracción del olote

Estos resultados muestran que es posible incrementar el rendimiento en la extracción al usar metodologías más amigables con el medio y así obtener un producto de valor agregado usando materiales que son actualmente destinados para alimentación animal y consumo local. Esto ayuda a dar al sector agrícola ya que si se logra explotar esta fuente de antocianinas tendrán una aplicación diferente y a nivel industrial, contribuyendo a la conservación de estos maíces que son originarios de México.

8.3.6 Fenoles Totales

Las antocianinas encontradas en el totomoxtle y olote de maíz no son los únicos polifenoles que se extraen, ya que se encuentran también los ácidos ferúlico, cumárico, protocatecuico, vanílico, derivados de la quercetina y hesperidina (Pedreschi et al, 2005) los cuales ayudan a la estabilidad de las antocianinas por el efecto de copigmentación.

Se determinaron los fenoles totales del extracto obtenido en cada método de extracción. Los resultados de la tabla 27 muestran que el olote presenta una mayor cantidad de polifenoles que el totomoxtle.

Tabla 26. Concentración de polifenoles en los diferentes tratamientos de extracción para el totomoxtle y olote

POLIFENOLES EN LOS DIFERENTES MÉTODOS mg ác. Tánico/g muestra					
Maceración		Sonicación		Microondas	
Olote	Totomoxtle	Olote	Totomoxtle	Olote	Totomoxtle
50.19±1.80	41.08±3.72	47.51±0.53	44.03±0.53	55.71±1.21	46.89±2.04

Se han reportado que el contenido de polifenoles totales son de 1.7-34.0 mg/g en una variedad de maíces desde los amarillos hasta los negros (López *et al*, 2009), el estudio fue realizado en el grano lo presentando un menor contenido de polifenoles ya que hay mayor cantidad de almidón y proteínas, sin embargo se llegó a la conclusión que el maíz que tiene mayor cantidad de polifenoles 34 mg/g es maíz morado, que en comparación con el olote y las hojas es menor ya que se encontró que en el totomoxtle se extraen 47 mg/g y 56 mg/g en el olote con el método de microondas. En el método de maceración, para el olote el contenido de polifenoles fue de 50.19 mg/g de los cuales el 47.6% son antocianinas, mientras que para el totomoxtle se obtuvieron 41.08mg/g de polifenoles, de los cuales el 53.3% son antocianinas. Para el método de sonicación se obtuvieron 47.51 y 44.03 mg/g de polifenoles para el olote y totomoxtle, respectivamente, el 51.2% y 58.6% de estos polifenoles son antocianinas, por último para el método de microondas el contenido de polifenoles fueron de 55.51 mg/g para el olote y 46.89 mg/g para el totomoxtle de los cuales el 35.5% y 52.2% son antocianinas respectivamente. Los resultados muestran que el olote tiene mayor cantidad de polifenoles diferentes a las antocianinas, mientras que el totomoxtle presenta mayor cantidad de antocianinas en relación a otros polifenoles.

Si se comparan los métodos de extracción en relación a la extracción de polifenoles se observa que con el método de microondas se logró la mayor extracción, lo que apoya la

teoría de la degradación de las antocianinas, ya que los otros polifenoles no son tan sensibles a la temperatura. Lo que representaría que el mejor método de extracción de polifenoles es la extracción asistida por microondas.

8.3.6. Identificación en HPLC

Para la identificación del perfil de antocianinas se usó la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) ya que es el método más común para el análisis de antocianinas. El extracto que se inyectó fue el obtenido de la dilución 1:10 con 40% de ácido acético en todos los casos para tener un pH de 2 y se pudieran resolver mejor las señales del cromatógrafo.

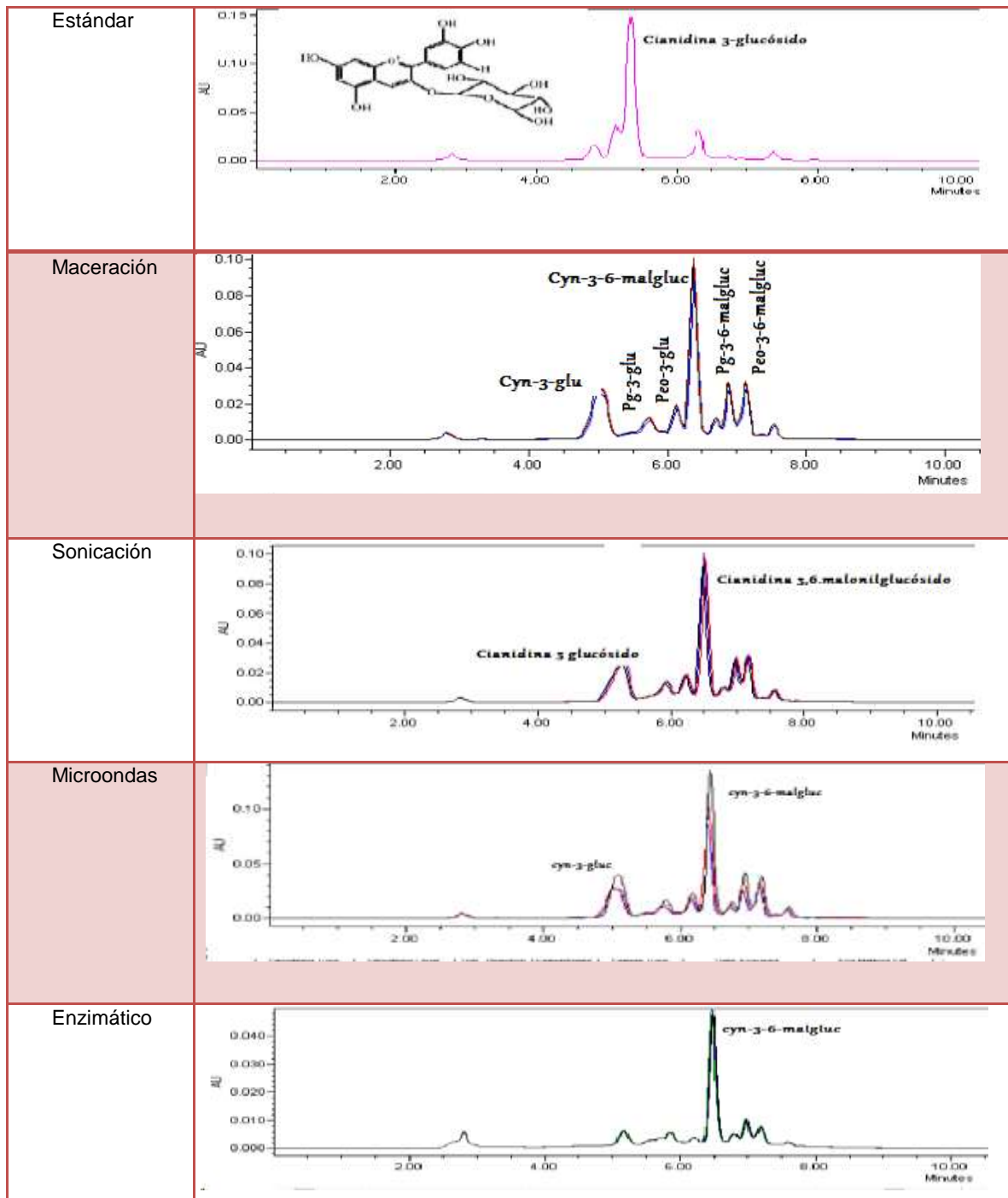
La identificación de las señales de las antocianinas fue realizada en base a la comparación en el caso de la cianidina-3-glucósido de un extracto concentrado de epidermis de ciruela la cual presenta cianidina-3-glucósido en mayor cantidad (tabla 28), la identificación de los picos restantes se hizo mediante una comparación con artículos en el cual se presentaba el mismo perfil.

De esta forma se puede apreciar que se obtuvieron 6 antocianinas las cuales se identificaron como cianidina-3-glucósido (cyd-3-glu), pelargonidina-3-glucósido (pg-3-glu), peonidina-3-glucósido (peo-3-glu), cianidina-3-6malonilglucósido (cyd-3-6-malglu), pelargonidina-3-6malonilglucósido (pg-3-6-malglu) y peonidina-3-6malonilglucósido (peo-3-6-malglu). Siendo la más abundante la cianidina-3-6malonilglucósido, lo que concuerda con el estudio realizado en el olote de maíz por Pu Jing en el 2006.

Este perfil se observó tanto en las muestras del totomoxtle como las del olote, las cuales se aprecian que son iguales en los diferentes métodos. Y entre el método de maceración, sonicación y microondas no se aprecia ningún cambio en el perfil sin embargo con el tratamiento enzimático se aprecia que se disminuyó la cantidad de pelargonidina y peonidina en comparación con la cianidina-3-6-malonilglucósido, esto debido a que la concentración de antocianinas es más baja en la extracción enzimática por lo que no se pueden apreciar claramente todas las antocianinas presentes.

Es importante conocer el perfil de antocianinas ya que se puede saber de una manera general cuál es su estabilidad, ya que al estar las antocianinas aciladas son más estables a los cambios de pH, temperatura que otras antocianinas que no estén aciladas.

Tabla 27. Cromatogramas del perfil de antocianinas obtenidos en los diferentes tratamientos de extracción empleados



ETAPA 4

8.4. Evaluación de Estabilidad de Antocianinas del Totomoxtle

Las antocianinas presentan una sensibilidad a la luz, temperatura, cambios de pH, metales, entre otros factores razón por la cual es necesario protegerlas usando diferentes vehículos y ácido adecuado para su almacenamiento.

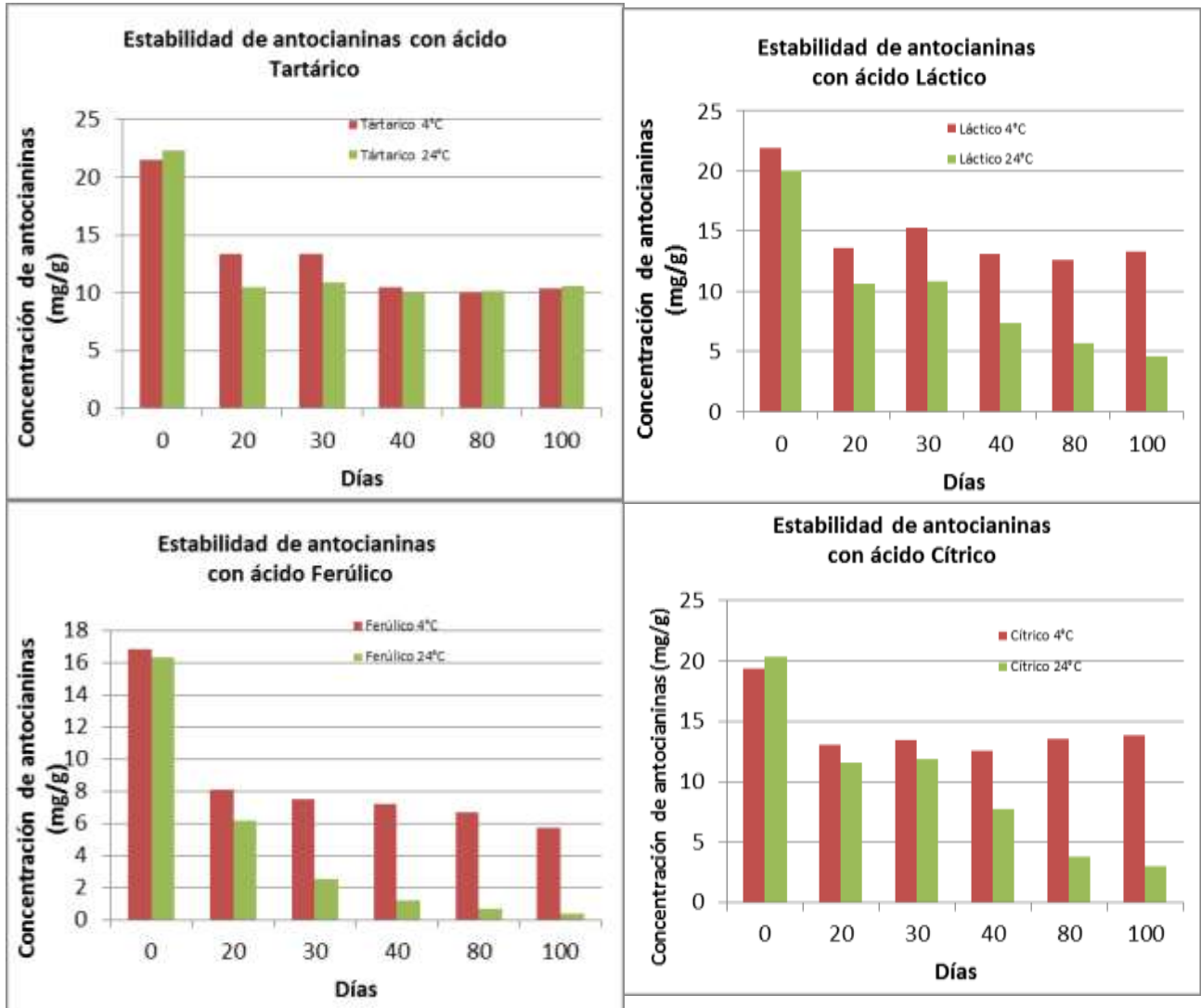
8.4.1. Estabilidad frente a diferentes ácidos

Se realizó la extracción de antocianinas del totomoxtle con cuatro diferentes ácidos: tartárico, láctico, cítrico y ferúlico. Se almacenaron a temperatura ambiente los extractos obtenidos y se guardó un control en refrigeración.

Los resultados obtenidos se muestran en las gráficas siguientes, donde se muestra que las antocianinas permanecen en una concentración estable después de los 20 días a una temperatura de 4°C, mientras que los extractos almacenados a temperatura ambiente muestran una disminución de antocianinas conforme pasan los días. El extracto que contiene ácido tartárico muestra una estabilidad tanto a temperatura ambiente como en refrigeración, mientras que el ácido ferúlico presenta una mayor degradación de antocianinas.

Tabla 30. pH del etanol acidificado al 1% con los diferentes ácidos usados para la estabilización

Ácido utilizado al 1%	pH
Tartárico	2.99
Láctico	3.62
Cítrico	3.67
Ferúlico	3.97



Gráfica 15 Estabilidad de antocianinas en diferentes tiempos, usando diferentes ácidos. La primera gráfica muestra la estabilidad del ácido tartárico, la segunda el ácido láctico, la tercera el ácido ferúlico y la cuarta el ácido cítrico

Los resultados en la extracción de antocianinas no presentaron diferencia significativa, sin embargo durante el almacenamiento se observó que para cada ácido la degradación es diferente, una de las explicaciones de porque el ácido tartárico presenta una mayor estabilidad en el contenido de antocianinas es debido al pH que se alcanza en solución, donde se observa que el orden en el que aumenta el pH es Tartárico<Láctico<Cítrico<Ferúlico que es el orden en el que se presentó en la degradación de las antocianinas. El extracto fue más estable con ácido tartárico que con ácido láctico.

8.4.2. Evaluación de color frente a diferentes vehículos.

Las antocianinas son compuestos inestables por lo que es necesario mejorar su estabilidad, se usaron tres vehículos diferentes para brindar protección: inulina, dextrina y harina de amaranto.

Del extracto obtenido de antocianinas de totomoxtle se le adicionó la cantidad de vehículo suficiente para obtener un polvo, debido a que cada vehículo tiene propiedades diferentes se obtuvo una relación vehículo: extracto diferente para cada uno, las cuales se muestran en la tabla 30, donde se observa que se necesitan 8 veces más de inulina para estabilizar las antocianinas, mientras que solo se necesitan 2 veces más de harina de amaranto para lograr los mismos resultados, como resultado de esta variación se obtienen productos de diferentes concentraciones de antocianinas.

Tabla 31. . Relación de vehículo:extracto y concentración de antocianinas en los diferentes vehículos

Vehículo	Relación Vehículo:Extracto	Concentración de antocianinas (mg/g _{colorante})
Harina de Amaranto	2:1	10.0
Dextrina	4:1	6.49
Inulina	8:1	3.59

La función del vehículo es hacer más estable a las antocianinas ya que no permiten que reaccionen entre sí, mejorando su vida de anaquel, además la ventaja que se presenta es que cada vehículo usado brinda características diferentes.

Los vehículos que se probaron fueron harina de amaranto, dextrina e inulina debido a que se han usado para la estabilización de colorantes (Paredes et al, 2006) (Parra, 2011). Los resultados se muestran en la tabla 31, donde se ve el efecto en el color de los diferentes vehículos así en la presentación líquida la inulina es la que presenta una mayor luminosidad debido a que es la que presenta una menor cantidad de antocianinas, mientras que la harina de amaranto presenta la menor luminosidad por tener una mayor concentración de antocianinas y por qué no se logró solubilizar todo el colorante. Lo mismo pasa con el parámetro a que muestra una mayor tendencia al rojo en el caso de la inulina y en el parámetro b que representa la tendencia al color amarillo es igual en la inulina y

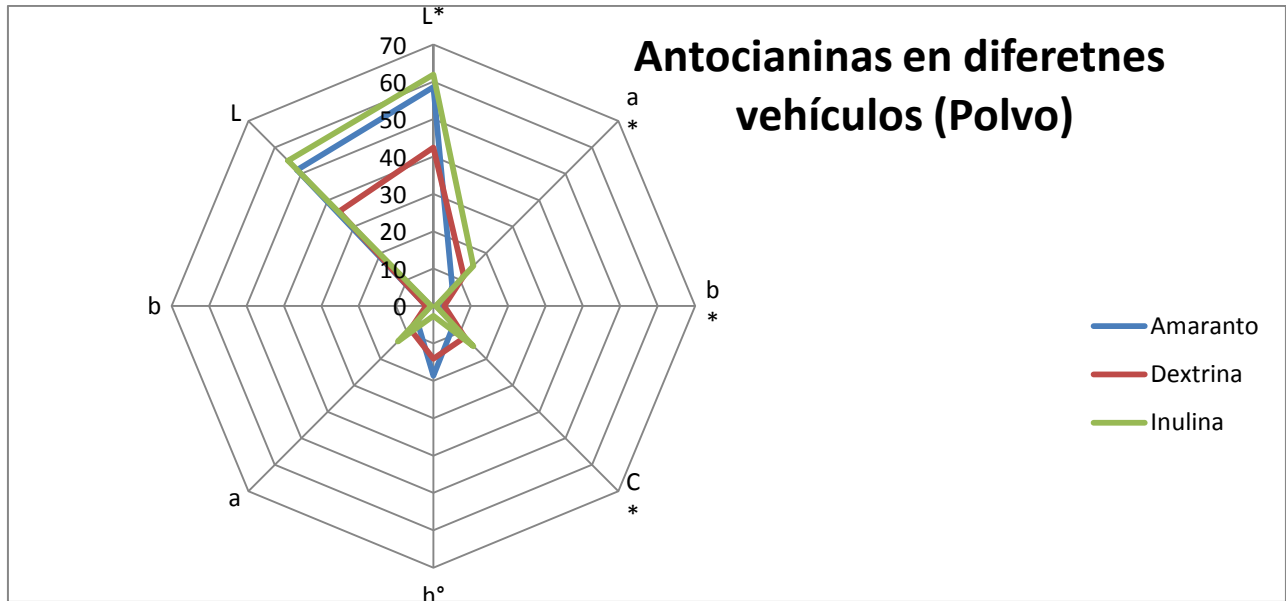
dextrina, pero la dextrina presenta una mayor intensidad en el color lo que se observa con el parámetro H°.

En los resultados observados en las muestras en polvo se observó una mayor variación en los datos la inulina es la que tiene una tonalidad mas tenue mientras que el amaranto y la dextrina presentan una mayor tonalidad. La luminosidad es similar en el amaranto que en la inulina pero menor en la dextrina.

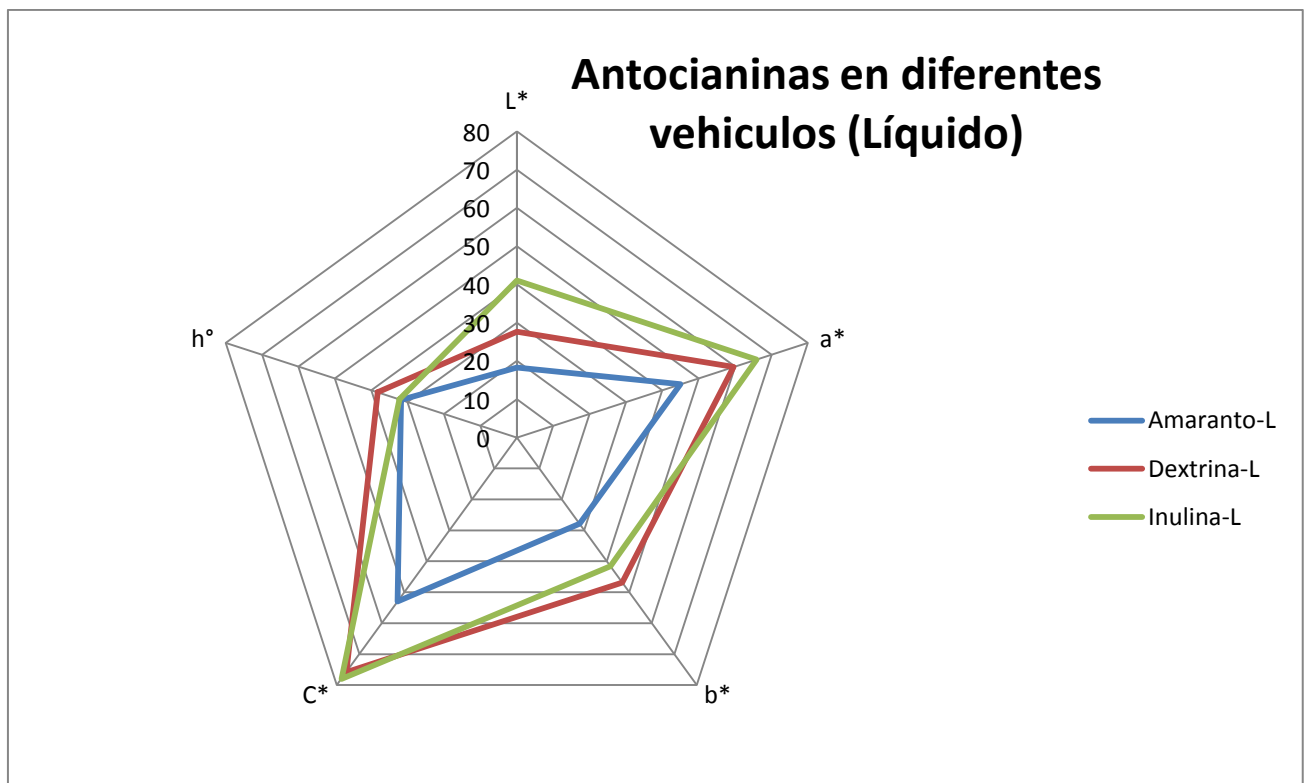
Estos resultados demuestran la importancia de la elección del vehículo adecuado ya que dependiendo de la aplicación que se le vaya a dar se debe escoger uno que cumpla con los requerimientos del proceso, por ejemplo no es posible usar el amaranto como vehículo cuando se quiere aplicar las antocianinas en una bebida ya que su solubilidad no es la adecuada.

Tabla 32. Evaluación del color en las diferentes presentaciones del colorante a base de antocianinas

	Vehículo	CIE L*a*b*				
		L*	a*	b*	C*	H°
Líquido (%Transmitancia)	Amaranto	18.24±0.59	45.01±0.64	27.90±0.47	52.96±0.80	31.79±0.06
	Dextrina	27.62±0.15	59.59±0.16	46.87±.11	75.81±0.19	38.19±0.01
	Inulina	41.05±0.69	65.94±0.28	41.57±0.60	77.96±0.08	32.23±0.48
Polvo (% Reflectancia)	Amaranto	58.56±0.85	7.13±0.42	2.43±0.59	7.55±0.57	18.65±3.40
	Dextrina	42.44±0.36	11.43±0.15	2.86±0.22	11.79±0.16	14.06±1.05
	Inulina	61.90±0.92	15.17±0.19	0.70±0.27	15.16±0.19	2.59±0.22



Gráfica 16 Comparación del color de las diferentes presentaciones en polvo (Harina de Amarantho, Dextrina e Inulina)



Gráfica 17 Comparación del color de las diferentes presentaciones en polvo (Harina de Amarantho, Dextrina e Inulina)

9. CONCLUSIONES

Se obtuvieron las mejores condiciones de extracción de antocianinas del totomoxtle de maíz criollo morado para su uso en alimentos, usando el método de maceración las cuales son:

Disolvente: Etanol 80%
Relación S/D: 1/10
Número de extracciones: 2
Ácido: Tartárico 1%
Tiempo: 30 min

Sin embargo no hay que olvidar que el mejor disolvente para la extracción de antocianinas es el metanol al 80% pero debido a su toxicidad no es permitido en la industria de alimentos, por lo que se usó únicamente con fines de comparación.

Ya obtenidas estas condiciones se obtuvieron de 26-21mg_{cyd}/g del totomoxtle y del olote 24-21mg_{cyd}/g.

En una siguiente etapa se evaluaron los métodos de extracción. En el caso del método de sonicación se determinó que la extracción aumenta un 6 % al aumentar la potencia de 70 W a 100w, Obteniendo así un máximo de antocianinas de totomoxtle de 26 mg_{cyd}/g. Además del contenido de antocianinas, el tiempo de extracción es afectado por la potencia, obteniendo 20 min de extracción al usar el sonicador de 100 W y 30 min al usar el sonicador de 70 W igualando así el método de maceración. Para el método de microondas el mejor tiempo de extracción de antocianinas del totomoxtle es de 60 segundos obteniendo 25 mg_{cyd}/g y se observó que al aumentar el tiempo de extracción en microondas se disminuye el contenido de antocianinas. En la extracción asistida por enzimas a partir del residuo de la extracción del totomoxtle se determinó que las enzimas Celluclast y las xilanasas extraen de manera equivalente las antocianinas del totomoxtle, usando una concentración óptima de 10% (v/v), un pH de 5, a 30°C, el tiempo de extracción de antocianinas usando xilanasas es de 6 horas mientras que al usar Celluclast el tiempo de extracción es de 12 horas con estas condiciones el uso de enzimas aumenta 3.7% el rendimiento de la extracción de antocianinas.

Tomando en cuenta que ya se evaluaron 4 metodologías diferentes para la extracción de antocianinas del totomoxtle y olote de maíz criollo morado, se llegó a la conclusión de que a pesar que el residuo de la extracción aun presenta color, la máxima cantidad de antocianinas extraíble es de 28 mg/g tomando en cuenta que al usar etanol al 80% se extrae el 94% de las antocianinas en comparación con el uso de metanol al 80%.

Al evaluar el contenido de fenoles totales se determinó que las antocianina obtenidas representan entre el 47-58% de los polifenoles. El perfil de antocianinas consta de 6 antocianinas, de las cuales se presenta en mayor concentración la cianidina-3-6-malonilglucósido, seguida de la cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-6-malonilglucósido y peonidina-3-6-malonilglucósido y en menor concentración la pelargonidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido.

En la última etapa se evaluó la estabilidad del extracto de antocianinas obtenidas del totomoxtle frente a diferentes ácidos dando mejores resultados el ácido tartárico debido a que presentó una mayor estabilidad con respecto al tiempo. Al encapsular las antocianinas en diferentes vehículos se observó una coloración diferente dependiendo del vehículo usado lo que representa una diversificación en los colores obtenidos.

10. RECOMENDACIONES

Los métodos modernos de extracción representan un aumento en los rendimientos de la extracción, además de contribuir con el cuidado del ambiente. En el uso del ultrasonido es conveniente saber si al usar una mayor potencia se logra aumentar el rendimiento o disminuir el tiempo de extracción.

Para el uso de enzimas es conveniente evaluar la posibilidad de adicionarlas al principio de la extracción para determinar si se aumenta la extracción e 3.7% que se obtiene del residuo, ya que se han reportado buenos resultados al realizar la extracción asistida por ultrasonidos y enzimas de manera conjunta.

La estabilidad de antocianinas depende de diversos factores por lo que es necesario realizar un estudio más profundo y determinar que interacciones se presentan con cada uno de los vehículos usados para su estabilización.

11. REFERENCIAS

- Aguilera, M., Reza, M. d., Chew, R., & Meza, J. A. (2011). Propiedades Funcionales de las Antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 2: 16-22..
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos* (4° ed.). Pearson.
- Banga, J. R., Balsa-Canto, E., Moles, C. G., & Alonso, A. A. (2003). Improving food processing using modern optimization methods. *Food Science and Technology*, 14: 131-144.
- Beirão da Costa, S., & et.al. (2012). Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. *Journal of Food Engineering*, 110: 190-199.
- Benitez, C. (2006). El maíz: Origen, composición química y morfología. *Materiales Avanzados*, 7: 15-20.
- Bernal, J., J.A.Mendiola, Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2011). Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55: 758-774.
- Boluda, J. C., Duque, B., Gulyas, G., Aragón, Z., Duque, A., & Díez, F. (2006). Lignanos: enterolignanos y actividad estrogénica. *Revista de Fitoterapia*, 47-57.
- Brett, C. (1996). *Physiology and Biochemistry of plant cell walls* (Segunda ed.). Gran Bretaña: Chapman & Hall.
- Bridle, P., & Timberlake, C. (1996). Anthocyanins as natural food color-selected aspects. *Food Chemistry*, 58: 103-109.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. d., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2008). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.001.
- Chacón, S. O., & Waliszewski, K. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Redalyc*, 21: 113-122.
- Chi-Tang, H., Mohamed, M. R., & Ghai, y. G. (2008). Sustancias bioactivas: Nutracéuticas y tóxicas. En F. Owen R., & D. K. Srinivasan, *Química de los alimentos* (págs. 747-772). Zaragoza (España): ACRIBIA.
- Chun-Ying, L., Hee-Woong, K., Se-Ra, W., Hwang-Kee, M., Ki-Jin, P., Jong-Yeol, P., y otros. (2008). Corn Husk as a potential source of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 11413-11416.
- Codex, A. (s.f.). *Biblioteca Virtual de desarrollo sostenible y salud ambiental*. Recuperado el 11 de Mayo de 2012, de <http://www.bvsde.paho.org/bvstox/e/fulltext/codex1a/codex1a.pdf>

- Cuevas, M. E. (2008). Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz (*Zea mays*) boliviano. Cartagena: Comunidad Europea.
- Dykes, L., & L.W. Rooney. (2007). Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World*, 105-111.
- Elizondo, J., & Boshini, C. (2002). Producción de forraje con maíz criollo y maíz híbrido. *Agronomía Mesoamericana*, 13(1): 13-17.
- El-Sayed, A.-A., Young, C., & Rabalski, I. (2006). Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4696-4704.
- Escalona López, S. E. (2004). Encapsulados de luteína, antocianina y su aplicación en alimentos. Santiago: Tesis de licenciatura. Universidad de Chile.
- Fennema, O. (2008). Química de Alimentos. Zaragoza, España.
- Florian C., S., & Reinhold, C. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food and in human nutrition. *Food Science and Technology*, 15: 19-38.
- Gómez de León, S.-G. (2006). Extracción química enzimática del ácido ferúlico presente en diferentes variedades de maíz mexicano. *Revista Salud Pública y Nutrición*, edición especial No. 11.
- Giusti, M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.
- Hoz, A. D., Alcázar, J., Carrillo, J., Herrero, M. A., Muñoz, J. D., Prieto, P., y otros. (2011). Reproducibility and Scalability of Microwave-Assisted Reactions. En U. Chandra, *Microwave Heating*. InTech.
- Hurtado, N. H., L. Morales, A., González-Miret, M. L., Escuder-Gilete, M. L., & Heredia, F. J. (2009). Colour, pH stability and antioxidant activity of anthocyanin rutinosides isolated from tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chemistry*, 117: 88-93.
- INE, D. d., CONABIO, C. N., & Secretaría de agricultura, g. d. (5 de Junio de 2008). Agrobiodiversidad en México: el caso del maíz.
- Jing Pu, M. (2006). Purple corn anthocyanins: chemical structure, chemoprotective activity and structure/function relationships. *Ohio state University: Food Science and Nutrition Graduate Program*.
- Jing, P., & Giusti, M. (2005). Characterization of anthocyanin-rich waste from purple corn cobs (*Zea mays* L.) and its application to color milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 8775-8781.
- Kamei, H., Hashimoto, Y., Koide, T., Kojima, T., & Hasegawa, M. (1998). Effect of methanol extracts from red and white wines. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 13(6): 447-452.

- López-Martínez, L. X., Oliart-Ros, R. M., Valerio-Alfaro, G., Lee, C.-H., Parkin, K. L., & Garcia, H. S. (2009). Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *Food Science and Technology*, 42: 1187-1192.
- Maier, T., Göppert, A., Kammerer, D. R., Schieber, A., & Carle, R. (2008). Optimization of a process for enzyme-assisted pigment extraction from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *European Food Research and Technology*, 227 (1): 267-275.
- Martínez, G., & Gómez, M. A. (2007). Ciclodextrinas: Complejos de inclusión con polímeros. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 8(4): 300-3012.
- Mateus, N. a. (2009). Anthocyanins as Food Colorants. En D. K. Gould Kevin, *Anthocyanins: Biosynthesis, Functions and Applications* (págs. 283-304). New Zeland: Springer.
- Olvera Santibañez, C. D. (2011). Obtención del ácido cumárico a partir de desechos agrícolas de maíz. México D.F.: Tesis UNAM.
- Ortega C. (2007). Conocimiento de la diversidad y distribución actual del maíz nativo y sus parientes silvestres en México. México: Documento del proyecto presentado ante la CONABIO. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Øyvind, M. A., & Kenneth, R. M. (2006). *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. New York: Taylor & Francis.
- Paredes, O., Guevara Lara, F., & Bello Pérez, L. A. (2006). Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. México D.F.: Fondo de Cultura Económica.
- Parra Huertas, R. A. (2011). Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 63(2): 5669-5684.
- Pedreschi, R., & Cisneros-Zevallos, L. (2005). Phenolic profiles of andean purple corn (*Zea mays* L.). *Food Chemistry*, 100 (3): 956-963.
- Pedroza, R. (2002). Alimentos Microencapsulados: Particularidade de los Procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. *Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. México.
- Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assited extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30 (1): 37-44.
- Reyes, P. (1990). *El maíz y su cultivo*. México: AGT.
- Ruiz Torres Norma, R. S. (2008). Determinación de compuestos fenólicos y su actividad antioxidante en granos de maíz. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31: 29-34.
- Rupusudan, P., Granados, G., & René, H. y. (2001). El maíz en los trópicos, mejoramiento y producción. *Colección FAO: producción y protección vegetal*, No 28.

- SAGARPA. (s.f.). <http://www.sagarpa.gob.mx>. Recuperado el 23 de Marzo de 2012, de <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Selecci%C3%B3n%20y%20manejo%20de%20ma%C3%ADces%20criollos.pdf>
- Salinas Moreno, Y. S. (2008). Características fisicoquímicas y contenido de carotenoides en maíces (*Zea mays* L.) amarillos cultivados en el Estado de México. *Agricultura Técnica en México*, 34 (3): 357-364.
- Salinas Moreno, Y., Fernando, M. B., Soto Hernández, M., Rafael, O. P., & Arellano Vázquez, J. L. (2003). Efecto de la nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maíces pigmentados. *Agrociencia*, 37: 617-628.
- Salinas-Moreno, Y., Soria-Ruíz, J., & Espinosa-Trujillo, E. (2010). Aprovechamiento y distribución de maíz azul en el Estado de México. Instituto Nacional de Investigadores Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Estado de México: Comité Editorial de CIRCE.
- Shipp, J., & EL-Sayed, M.-A. (2010). Food application and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients. *The Open Food Science Journal*, 4: 7-22.
- Straus, J. (1959). Anthocyanin synthesis in corn endosperm tissue culture: identity of the pigments and general factors. *Plant Physiology*, 536-540.
- Styles E.D. and Ceska, O. (1972). Flavonoid pigments in genetic strains of maize. *Phytochemistry*, 11 (10): 3019-3021.
- Taiz, L. (1991). *Plant Physiology* (Cuarta ed.). EUA: Benjamin/Cummings Publications.
- Tiwari, B., O'Donnell, C., & Cullen, P. (2009). Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. *Journal of Food Engineering*, 93: 166-171.
- Tiwari, B., Patras, A., Brunton, N., P.J.Cullen, & O'Donnell, C. (2010). Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17: 598-604.
- Valdez-Morales, Maribel; Valverde-González, María Elena; Paredes-López, Octavio. (2010). Potencial nutracéutico de huitlacoche: Efecto del genotipo de maíz y de la etapa de desarrollo sobre el contenido de fenoles y lípidos. *Encuentron Nacional de Biotecnología*. Mazatlán, Sinaloa.
- Zhang, H.-F., Yang, X.-H., & Wang, Y. (2011). Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions. *Food Science and Technology*, 22: 672-688.
- Zhendong, Y., & Weiwei, Z. (2010). Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11: 169-176.