

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**BIOCOLORANTES DE MAÍZ CRIOLLO DEL ESTADO
DE TLAXCALA. PERFIL DE ANTOCIANINAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

Mario Emilio García Romo



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Marco Antonio León Félix

VOCAL: Profesor: Arturo Navarro Ocaña

SECRETARIO: Profesor: Gloria Díaz Ruiz

1er. SUPLENTE: Profesor: Armando Conca Torres

2° SUPLENTE: Profesor: Hilda Elizabeth Calderón Villagómez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 321 Departamento de Alimentos y Biotecnología Conjunto E Facultad De Química UNAM

Asesor del tema: Dr. Arturo Navarro Ocaña

Supervisor técnico: Dra. Hilda Elizabeth Calderón Villagomez

Sustentante: Mario Emilio García Romo

Resumen

El maíz pertenece a la familia de las gramíneas y su nombre científico es *Zea mays*. Respecto a su origen botánico, tienen relación filogenética con una planta conocida como "teosintle o teosinte" (*Euchlaena mexicana*). Gracias a la transmisión de conocimiento de generación a generación durante siglos, se han desarrollado varias especies de maíz de color blanco, amarillo, rojo, morado y azul. La presencia de color se debe en gran medida a las antocianinas, compuestos presentes en el pericarpio y en la capa de aleurona o en las dos estructuras del grano. Son el grupo más importante de compuestos hidrosolubles, responsables de los colores. Por años estos compuestos han sido consumidos por el hombre sin ningún efecto perjudicial evidente y su incorporación en alimentos tiene la ventaja no sólo de impartir color, sino que por las propiedades antioxidantes que poseen, se pueden considerar como alimentos funcionales. Por todo lo descrito anteriormente y por muchas otras razones que incumben a otras disciplinas, no es de extrañar que sea una de las plantas más estudiadas en el mundo. La presente investigación tiene como propósito de determinar el perfil de las antocianinas pelargonidina-3-glucósido y cianidina-3-glucósido en diferentes granos coloridos de maíz criollo. La parte experimental se aboca a la identificación, separación y cuantificación de estas antocianinas por métodos cromatográficos así como la búsqueda de sistemas óptimos para la extracción. Se obtuvo el perfil cuantitativo de estas moléculas complementándolo con nuevos sistemas para la identificación de estas moléculas por cromatografía en capa fina así como un sistema base para la obtención de estándares de estas, así como con nuevos sistemas de extracción de estas moléculas.

Palabras clave: Biocolorantes, maíz criollo, antocianinas

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mis padres, Mario Y Rosa María por todo el apoyo y cariño que me han brindado en toda mi vida, gracias por todo y por todo lo que viene, también quiero agradecer a mi hermana Sofía por todos los buenos momentos y las risas que no hemos sacado uno a otro, gracias niña sígueme dando a esa danza guerreira.

A una persona con quien he compartido mi vida durante muchos años los cuales sin duda han sido de los más felices, quien ha estado a mi lado en los buenos y los malos momentos, no hay palabras para expresar todo lo que significas para mi, gracias Tania sin ti no hubiera llegado a este momento, este trabajo va especialmente dedicado a ti.

A todos los maestros de la facultad que a través de los años compartieron sus conocimientos en las aulas y fuera de ellas.

A mi mejor amigo de toda la vida mi primo Arturo, por acompañarme durante todo este tiempo, y a mis tíos Martha y Alfonso

A mis queridos amigos Javier Ruiz y Ramón Barrera por todas esas aventuras, desveladas y tertulias que pasamos juntos, espero que siempre tengamos un tiempito para repetirlos. A Israel Benitez uno de mis grandes colegas de la facultad que muy a su estilo me ayudo mucho en nuestra apasionante carrera y todas esas inolvidables tardes en la biblioteca central.

A todos los tresventiuneros (Charly, Pepe, Hipo, Rulo, Romina, Gus, Viri, Cindy, Rod, Eri) como me gustó estar con ustedes en el laboratorio, y en esas inolvidables tardes y todo lo que compartimos, les deseo mucho éxito a todos.

A la familia Moreno de Ixtenco que tan amablemente contribuyo a conseguir las variedades de maíz para esta investigación.

A la Familia Sanchez de Vicente Guerrero Tlaxcala por su amistad y su apoyo.

A toda la banda del cubo de la prepa 6 por todos esos momentos que pasamos juntos en el corazón de Coyoacán.

A las mejores nutriólogas de Tlaxcala: Guadalupe y a ese mole tan delicioso que prepara tu mama y Araceli "Partner" que contribuyo en gran medida en esta investigación, con su esfuerzo y dedicación en esas largas tardes de extracciones, gracias Ara esta tesis también es parte tuya.

A Ángel "chavo mil heridas" por los buenos momentos que hemos pasado en estos años y los que vienen que seguramente serán mejores gracias chavo eres el mejor.

A todo el equipo de producción de la Gerencia Metropolitana Norte aprendí mucho con ustedes y a mis compañeros del servicio social

A mis buenos amigos de la facultad, Gerardo "botero", Marisol que buen equipo de analítica, a Dianita y a Alex, mi brother Felipe, Lizet, Josue, Melina nunca olvidare el laboratorio de toxi, Dalia, Sergio como olvidarte mi buen, Jannet, Nancy, Lilita, Demetrio gracias chicos no olvido los buenos momentos que tuvimos juntos en esas frías tardes en la pecera, en la biblio o en los alrededores de la facultad.

Al Doctor Arturo por darme la oportunidad de llevar a cabo esta investigación y a la Doctora Hilda que me ayudo muchísimo en el transcurso de la investigación.

Y a todos aquellos que se me han escapado de la memoria una disculpa pero saben que los aprecio mucho.

Gracias a todos aunque el tiempo y la distancia nos alejen un poco siempre los tengo presentes.

“Por mi raza hablara el espíritu”
Mario Emilio García Romo
Septiembre 2010

Indice

Capitulo 1 Introducción

1.1	Problemática.....	1
1.2	Objetivos.....	1
1.3	Alcances.....	2
1.4	Hipótesis.....	2

Capitulo 2 Antecedentes

2.1	Color.....	3
2.2	Colorantes.....	5
2.3	Biocolorantes.....	6
2.4	Clasificación de biocolorantes.....	7
2.4.1	Tetrapirroles (clorofila).....	8
2.4.2	Estructuras isoprénicas (carotenoides).....	11
2.4.3	Heterociclos con nitrógeno diferentes a tetrapirroles (Betalaínas y betaxantinas).....	14
2.4.5	Quinonas (acido carmínico).....	17
2.5	Benzopiranos (antocianinas).....	19
2.5.1	Distribución.....	19
2.5.2	Biosíntesis.....	21
2.5.3	Estructura.....	24
2.5.4	Factores que afectan la estabilidad de la estructura.....	25
2.5.4.1	Glicosilación.....	25
2.5.4.2	Hidroxilación y metoxilación.....	27
2.5.4.3	Ph.....	28
2.5.4.4	Temperatura.....	30
2.5.4.5	Luz.....	31
2.5.5	Oxígeno.....	32
2.5.6	Enzimas.....	32
2.5.7	Interacción con metales.....	33
2.5.8	Efecto de la concentración.....	34
2.6	Copigmentación.....	34
2.6.1	Copigmentos.....	36
2.6.2	Copigmentación intermolecular.....	37
2.6.3	Copigmentación intramolecular.....	38
2.7	Aspectos metodológicos para la obtención de antocianinas.....	40
2.7.1	Extracción.....	40
2.7.2	Purificación de extractos crudos.....	41
2.7.3	Cromatografía en capa fina.....	41
2.7.4	Cromatografía en contracorriente de alta velocidad.....	42
2.7.5	Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	42
2.8	Caracterización.....	43
2.8.1	Características espectrales.....	43
2.8.2	Espectroscopia de masas.....	44
2.8.3	Resonancia magnética nuclear.....	45
2.9	Función biológica.....	46
2.10	Antocianinas como nutraceuticos.....	47
2.11	Antocianinas como colorantes.....	48
2.12	Maíz.....	49
2.12.1	Origen del maíz.....	50
2.12.2	La planta del maíz.....	51

2.12.3	Estructura del grano de maíz.....	53
2.12.4	Aplicaciones del maíz.....	57
2.13	Estado de Tlaxcala	60
2.14	Municipio de Ixtenco.....	61

Capítulo 3 Metodología

3.1	Etapa I	64
3.1.1	Muestreo.....	64
3.1.2	Selección.....	64
3.1.3	Preparación de las muestras.....	66
3.1.3.1	Molienda seca.....	66
3.1.3.2	Extracción de pigmentos.....	66
3.1.3.3	Semi-purificación.....	66
3.1.3.4	Liofilización.....	67
3.2	Etapa II	
3.2.1	Cromatografía en capa fina para la obtención de estándares.....	67
3.2.2	Desarrollo de Sistema de Cromatografía en Capa Fina.....	67
3.2.3	Comparación con fuentes de antocianinas conocidas.....	68
3.2.4	Cromatografía a escala preparativa (mg)	68
3.3	Etapa III	
3.3.1	Optimización del sistema de extracción.....	69
3.3.2	Extracción con sistemas propuestos.....	69
3.3.3	Preparación del control.....	69
3.3.4	Cuantificación de antocianina total monoméricas.....	69
3.3.5	Comparación de antocianina total extraída	70
3.4	Etapa IV	
3.4.1	Adecuación de la metodología para HPLC.....	71
3.4.2	Elaboración de curva patrón y cuantificación por HPLC.....	71
3.4.3	Cuantificación.....	71

Capítulo 4 Resultados y discusión

4.1	Selección.....	72
4.2	Cromatografía en capa fina.....	74
4.3	Optimización del sistema de extracción.....	76
4.4	Cuantificación por HPLC.....	79

Capítulo 5 Conclusiones.....	85
-------------------------------------	-----------

Capítulo 6 Recomendaciones.....	86
--	-----------

Apéndice 1.....	87
------------------------	-----------

Bibliografía.....	88
--------------------------	-----------

Índice de Figuras

Figura 1	Espectro electromagnético.....	4
Figura 2	Percepción del color.....	5
Figura 3	Estructura de porfina y porfirina	9
Figura 4	Fórmula, sustitución y nomenclatura de las clorofilas.....	10
Figura 5	Estructura de los carotenoides y el sistema de numeración común. Los números cerca de cada carbono se dan de acuerdo a la nomenclatura semi-sistemática.....	12
Figura 6	Característica de los grupos finales de los carotenoides y sus nombres.....	13
Figura 7	Betalaínas y sus estructuras de resonancia.....	15
Figura 8	Ejemplos de betalainas	16
Figura 9	Acido carmínico	18
Figura 10	Biosíntesis de las antocianinas en maíz	23
Figura 11	Estructura ión flavilio.....	24
Figura 12	Estructura de antocianidina y una antocianina.....	25
Figura 13	Estructuras comunes de los monosacáridos y disacáridos en antocianinas de los alimentos	26
Figura 14	Estructura química de las principales antocianinas.....	27
Figura 15	Las cuatro principales formas de equilibrio de antocianina existentes	28
Figura 16	Distribución de las diferentes formas de equilibrio de malvidina 3- glucósido	29
Figura 17	La degradación de los antocianos monoglucósido a ph 3,7 acelerada por calor.	31

Figura 18 Mecanismo sugerido para la formación del complejo metal-antocianina-ácido	34
Figura 19 Interacciones de las antocianinas	35
Figura 20 Efecto hipercrómico y cambio batocrómico	36
Figura 21 Interacciones intermoleculares	37
Figura 22 Estructura de diferentes copigmentos	38
Figura 23 Ejemplo de acilación intramolecular	39
Figura 24 Crecimiento de la planta de maíz.....	52
Figura 25 Estructura del grano de maíz corte transversal	55
Figura 26 Composición del grano de maíz y sus partes anatómicas.....	57
Figura 27 Mapa del estado de Tlaxcala.....	62
Figura 28 Localización de Ixtenco en el estado de Tlaxcala.....	64
Figura 29 Coloración de los maíces muestreados.....	65
Figura 30 Maíces coloridos seleccionados de la muestra total.....	73
Figura 31 Cromatografía con los sistemas descritos en la literatura.....	74
Figura 32 Cromatoplaque con el sistema de elución desarrollado.....	75
Figura 33 Cromatograma y concentración de antocianinas en el maíz azul de punta roja	79
Figura 34 Cromatograma y concentración de antocianinas en el maíz violeta....	80
Figura 35 Cromatograma y concentración de antocianinas en el maíz Tlaxonole.....	80
Figura 36 Cromatograma y concentración de antocianinas en el maíz Moradilla.....	81
Figura 37 Cromatograma y concentración de antocianinas en el maíz Negro.	82
Figura 38 Cromatograma y concentración de antocianinas en el maíz Rojo Matizado.....	82

Figura 39 Cromatograma y concentración de antocianinas
en el maíz Coral..... 83

Índice de Tablas

Tabla 1 Clasificación de biocolorantes según su estructura química.....	8
Tabla 2 Clasificación de carotenoides.....	14
Tabla 3 Características de los pigmentos de grana cochinilla.....	18
Tabla 4 Antocianinas encontradas en diferentes tejidos de plantas.....	20
Tabla 5 Ocurrencia de antocianinas en algunas fuentes naturales que se utilizan como alimentos	21
Tabla 6 Clasificación del maíz (FAO).....	50
Tabla 7 Clasificación por tipo de maíz.....	56
Tabla 8 Producción nacional anual de maíz 2008.....	60
Tabla 9 Producción anual de maíz estado de Tlaxcala.....	60
Tabla 10 Producción anual de maíz municipio de Ixtenco.....	60
Tabla 11 Ejemplo sistemas de elución probados durante esta investigación...	68
Tabla 12 Sistemas propuestos para la extracción	69
Tabla 13 Antocianina total con acido A.....	76
...	
Tabla 14 Antocianina total con acido B	77
Tabla 15 Antocianina total con acido C	77
Tabla 16 Antocianina total con acido D	78
Tabla 17 Concentración de pealgonidina-3-glucósido y cianidina-3-glucósido de los maíces estudiados.....	84

Capítulo 1 Introducción

1.1 Problemática

En México, el maíz y los productos derivados de este pueden considerarse como algunos de los alimentos básicos de la población, alrededor de este nos encontramos implícita una larga lista de dinámicas comunitarias y familiares en torno a la siembra, la cosecha, el intercambio de jornadas, la preparación de alimentos, la celebración de fiestas, por mencionar algunas, que se observan principalmente en la región centro y sur del continente americano, que por su extensión, se ha requerido del interés, la sabiduría y la pasión de miles de experimentadores agrícolas lo que ha generado una gran cultura acerca del maíz. Sin embargo, muy a pesar de toda esta riqueza, en nuestro país, factores externos han influido en la pérdida y en la conservación del maíz nativo, por ejemplo: la expansión e intensificación de cambios en los cultivos por la contaminación con semillas genéticamente modificadas que ha surgido recientemente, causas socioeconómicas, como la migración de poblaciones campesinas y falta de apoyos a la producción.

En el maíz se ha reportado la presencia de moléculas de antocianinas en variedades de diferentes regiones de México y del mundo tanto de no-aciladas, como aciladas, acrecentando, en los últimos años, el interés por los pigmentos antociánicos y su investigación, debido no solamente al color que confieren a los productos que las contienen sino a su probable papel en la reducción de las enfermedades coronarias, cáncer y diabetes, efectos antiinflamatorios y mejoramiento de la agudeza visual y comportamiento cognitivo. Por lo tanto, además de su papel funcional como colorantes, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano.

1.2 Objetivos

Objetivo General

- Determinar el perfil de antocianinas (cianidina-3-glucósido y pelargonidina-3-glucósido) de los maíces criollos de la región de Ixtenco, Estado de Tlaxcala, México.

Objetivos particulares

- Realizar un muestreo y selección de maíces criollos coloridos cuya distribución de pigmentos sobre el pericarpio sea homogénea.
- Desarrollar un sistema de elución en cromatografía en capa fina que permita la identificación cualitativa del perfil de antocianinas presentes en las diferentes variedades de maíz criollo comparándolas con otras fuentes naturales.
- Optimizar las condiciones de extracción de antocianinas utilizando diferentes sistemas y acidificantes.
- Determinar cuantitativamente por HPLC las antocianinas que se estudiaron en las diferentes variedades de maíz criollo.

1.3 ALCANCES

Los resultados podrán establecer el perfil cuantitativo de dos antocianinas (cianidina-3-glucósido y pelargonidina-3-glucósido) que se encuentran en los maíces coloridos del municipio de Ixtenco.

Una vez establecido el perfil, la información será de utilidad para estudios posteriores de investigación en el desarrollo de técnicas de extracción y purificación de estas moléculas, así como su posible aplicación en otros campos o productos.

1.4 HIPOTESIS

El color que se observa en los maíces criollos coloridos se deberá a la presencia de antocianinas.

Capítulo 2 Antecedentes

2.1 Color

De nuestros cinco sentidos: vista, oído, tacto, gusto y olfato, el sentido de la vista juega un papel importante en nuestras continuas y cotidianas experiencias por el mundo que nos rodea, desde que despertamos, durante todo el día y hasta el sueño, nos apoyamos en nuestros ojos, ya sea consciente o inconscientemente ya que nos proporcionan información del entorno: movimiento, color, textura, distancia, entre otras, que determinan nuestras respuestas a la gran cantidad de señales que nos llevan a aceptar o rechazar las consecuencias de esta información en base a su importancia y la inmediatez de la acción demandada. Por ejemplo, el reconocimiento de la gente, la elección de la ropa a usar, las advertencias de los semáforos, la interpretación de las condiciones meteorológicas, el placer estético de ver el arte y la selección de nuestra alimentación cotidiana. El color se produce por el efecto combinado de características físicas, aspectos químicos y su percepción es un proceso complejo que implica fenómenos físicos. En su etapa inicial, la percepción del color es física, pero las etapas posteriores implican señales químicas que se transforman en las respuestas neuronales que serán interpretadas por el cerebro como el color. Tres elementos se conjugan: la luz, el objeto y el observador. Sin embargo, la medición objetiva del color es de gran importancia económica, y los esfuerzos para lograr mediciones objetivas han involucrado a numerosos grupos de investigación. Es en esta esfera del conocimiento donde el color se manifiesta en respuesta de un período estrecho del espectro electromagnético emitido por fuentes de luz (por ejemplo, la luz solar). La luz en sí misma no tiene color y el color no existe por sí mismo, sólo existe en la mente del espectador por lo que el color es una percepción relativa, debido a que cuando se describe el color de un material, la información adicional como por ejemplo, tipo y calidad de la luz, los ajustes del fondo, la ubicación y la distancia del espectador etc. Por otra parte, el estímulo físico mismo producirá diferentes respuestas en diferentes detectores (espectadores), por lo que el color se puede dividir en dos etapas: la primera consiste en puros fenómenos físicos y requiere de tres elementos: una fuente de la luz, un objeto (la materia en general), y el detector (por ejemplo, un ojo, un diodo), que funciona en el mismo principio como una cámara fotográfica. En la segunda etapa, un complejo proceso se produce (no es conocido totalmente), y los receptores de los ojos transmiten la información que el cerebro interpreta como color. Por lo anterior el color depende de la luz y por consiguiente en la fuente de la que es emitida. La luz está compuesta de

diferentes radiaciones de longitud de onda, y es el componente más importante en relación a la apreciación del color. La luz visible es una radiación con longitudes de onda entre 380 y 750 nm y, que es una parte muy pequeña del espectro electromagnético.

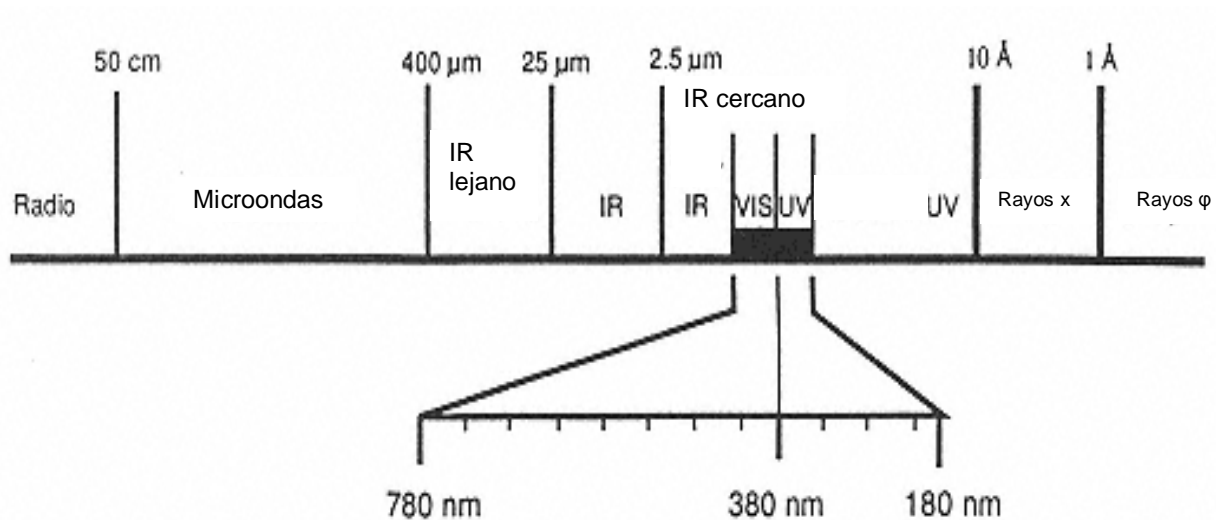


Figura 1 Espectro electromagnético (Delgado-Vargas, 2003)

Todos los colores percibidos por el ojo humano están asociados con la radiación de luz en este rango de valores: azul-violeta ($380 < \lambda < 480$ nm), verde ($480 < \lambda < 560$ nm), amarillo ($560 < \lambda < 590$ nm), de naranja ($590 < \lambda < 630$ nm) y rojo ($630 < \lambda < 750$ nm) véase *figura 1* y *2*. En la evaluación del color, el objeto debe ser iluminado, y en la interacción luz-objeto diferentes fenómenos físicos se observan: transmisión, refracción, absorción, dispersión, entre otros. En el fenómeno de transmisión, si la luz pasa a través del objeto y esencialmente, no cambia, entonces el objeto es transparente. Un objeto sin color transmite toda la luz con la excepción de una pequeña cantidad que se refleja. Por otra parte, si nada de la luz se transmite, por efecto de un proceso diferente, el objeto es negro y se dice que es opaco. Está claro que tenemos una amplia gama de posibilidades entre estos extremos (Delgado-Vargas, 2003).

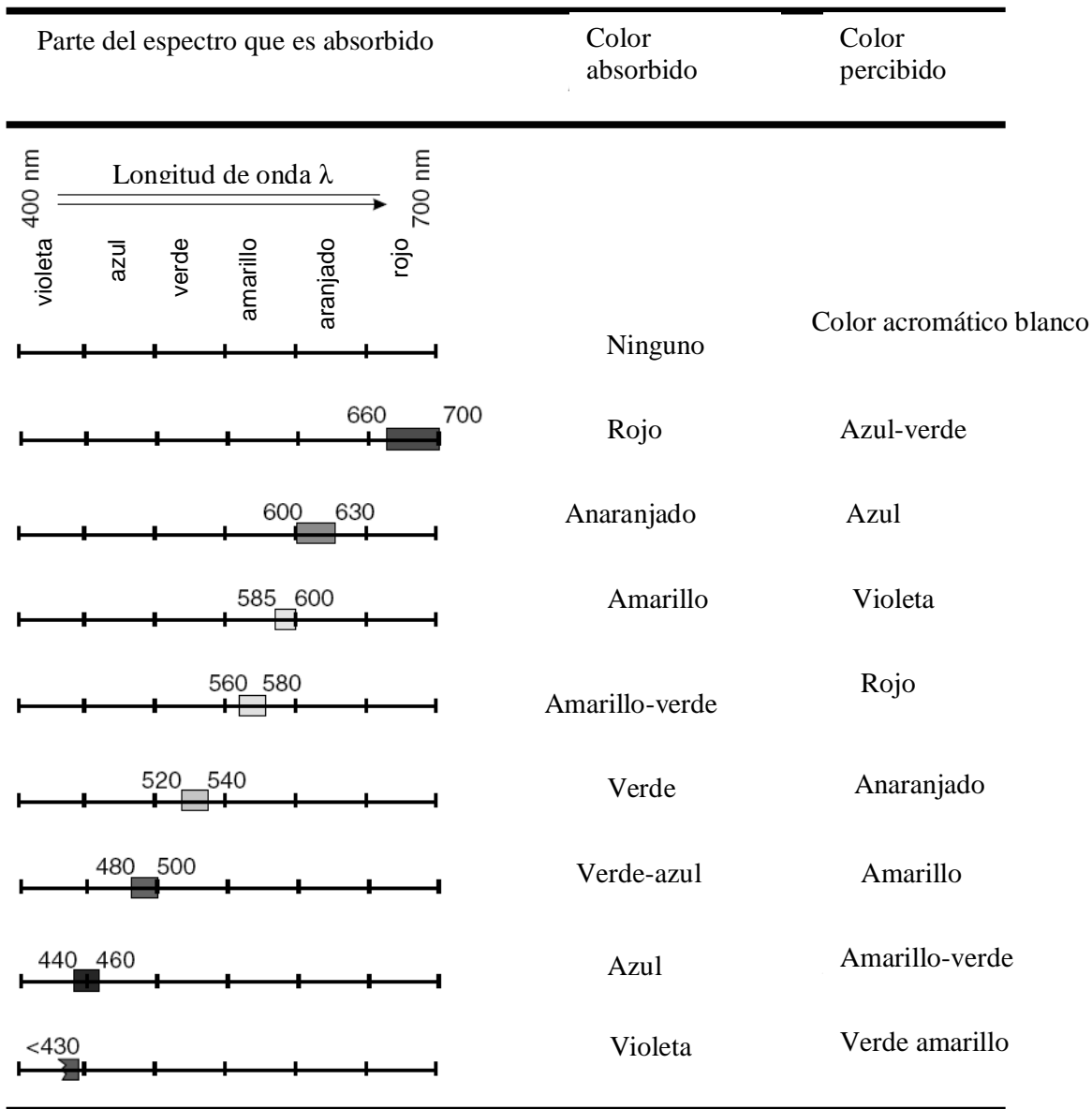


Figura 2 Percepción de color (Delgado-Vargas 2003)

2.2 Colorantes

Desde principios de la civilización, los productos alimenticios están hechos para dar una presentación atractiva por la adición de colorantes naturales. Los colorantes se han convertido en una parte sensible de cualquier producto no sólo por su atractivo, sino también, por mejorar la aceptación por el consumidor. Un aditivo de color se define como "un tinte, pigmento o sustancia" hecho o derivado de un vegetal, animal, mineral o de otra fuente y que, cuando se añade o aplica a un alimento, medicamento, cosmético o al cuerpo humano o parte de él, es capaz de impartir un mismo color (Branen et. al. 2001).

Por lo que se puede recurrir a una tinción de alimentos en las siguientes circunstancias:

- Para restaurar la coloración original de productos que han sufrido una pérdida por condiciones de proceso por ejemplo, en conservas de vegetales.
- Para uniformar la coloración de productos cuya intensidad de color varía por circunstancias naturales como las estaciones del año; por ejemplo, la mantequilla que tiene un color más amarillo en la época de los pastos verdes.
- Para remediar o intensificar productos de color más débil que lo esperado por el consumidor, como sucede en bebidas artificiales, helados, productos de confitería.

En cambio, debe rechazarse toda tinción que involucra un engaño del consumidor, enmascarando la verdadera calidad o descomposición del alimento (Schniidt-Hebbel, 1990)

El aspecto de los alimentos es fundamental en este proceso de elección del hombre para la selección de la comida. Nuestra elección de los alimentos se rige por muchos factores, en las sociedades ricas, donde hay abundancia y variedad de alimentos, la elección que se presenta en el supermercado moderno es inmensa y son capaces, en cualquier momento, de surtir miles de artículos, muchos de estos serán diferentes en tipo, pero otros serán de carácter similar, aunque suministrados por una gran variedad de fabricantes. Por lo que en cualquier supermercado o vitrina refrigerada o congelada se le presentarán al consumidor y este a su vez comenzara un proceso de decisión de lo que compra y con qué propósito, de aquí la importancia actual de los colorantes.

2.3 Biocolorantes

Los biocolorantes son como su nombre lo indica colorantes obtenidos de fuentes biológicas. El término biocolorante natural indica que la fuente del color es natural o de naturaleza idéntica por el creciente uso de biotecnología, mientras que el término biocolorante artificial indica que aunque el colorante se sintetiza biológicamente, se puede producir por reacciones químicas sin la necesidad de la fuente natural. Además, un biocolorante natural es diferente de un biocolorante artificial no sólo por su origen, sino también en la actividad fisiológica que pueden presentar además los subproductos y los materiales usados para su síntesis y las impurezas son mucho más amigables para el medio ambiente que sus homólogos químicos. Los pigmentos son ampliamente distribuidos en organismos vivos, y un gran número de estructuras han sido reportadas; como el grupo de las antocianinas que tienen más que 250 estructuras diferentes. Es común en la naturaleza encontrar pigmentos con gran complejidad

estructural, lo que hace que no sea una tarea simple establecer una clasificación universal que cubra todos los pigmentos conocidos, especialmente una clasificación que le permita la anexión de los pigmentos recién descubiertos.

Plantas, animales y microorganismos son fuentes de biocolorantes naturales, pero pocos de ellos están disponibles en cantidades suficientes para uso comercial como colorante de alimentos y en su mayoría son de origen vegetal. Algunos colorantes naturales obtenidos de origen vegetal son: pigmento de remolacha roja, uvas, azafrán. Sin embargo en la producción biotecnológica de estos colorantes, plantas y microorganismos ofrecen una alternativa, debido a su adecuada comprensión en las técnicas de cultivo y procesamiento. Hoy en día, existe la producción fermentativa de pigmentos de calidad alimentaria disponibles en el mercado, por ejemplo, el color de *Monascus sp.*, la astaxantina de *Dendrorhous xanthophyllomyces*, color rojo de *Oxalicum penicillium*, riboflavina de *Gossypii ashbya*, ϕ -caroteno de *Blakeslea trispora*. También un número de microorganismos producen biocolores en buena cantidad que incluyen a *Serratia* y *Streptomyces sp.* (Chattopadhyay, 2008). Para considerar los biocolores naturales como un colorante hay que tener en cuenta la estabilidad, el rendimiento y el precio, en su elaboración, que en su mayoría pueden ser restricciones, ya que la mayoría de ellos son sensibles al pH, el calor y la luz solar. A pesar de estos factores, la biocolorantes naturales van ganando importancia debido a su aporte en la salud, la nutrición, las actividades de tipo farmacéuticas, la moda y la conciencia por el medio ambiente. Además considerando que los colores derivados de minerales (plomo, cromatos, sulfato de cobre) pueden causar graves problemas de salud. Por lo que, en las últimas décadas los aditivos sintéticos son severamente criticados, y los consumidores muestran inhibición hacia estos productos, por consiguiente, prefieren utilizar productos con colorantes naturales (Chattopadhyay, 2008).

2.4 Clasificación de biocolorantes

La mayoría de pigmentos biológicos son agrupados en no más de cinco clases de estructuras:

Tetrapirroles, isoprenoides, quinonas, benzopiranos, heterociclos con nitrógeno diferentes a tetrapirroles. Los informes científicos han descrito aproximadamente a 34 tetrapirroles (28 cíclicos y 6 lineales), sobre 600 carotenoides, más de 4100 flavonoides y dentro de este grupo poco más de 250 antocianinas (aunque constituidas de sólo 17 antocianidinas). La variabilidad tremenda de organismos sobre el mundo impide que un

grupo numeroso de pigmentos misceláneos no se acomodan dentro de esta clasificación. En particular, es común encontrar informes en el descubrimiento de pigmentos nuevos en bacterias, hongos, e invertebrados, cuyas características estructurales no corresponden totalmente a un grupo o a otro (Delgado-Vargas 2003).

Tabla 1 Clasificación de biocolorantes según su estructura química (Chattopadhyay, 2008)

Estructura química	Ejemplo
Tetrapirroles	Clorofilas
Isoprenoides	Carotenos
Heterociclos con nitrógeno diferentes a tetrapirroles	Betalainas
Quinonas	Acido carmínico
Benzopiranos	Antocianinas

2.4.1 Tetrapirroles (clorofila)

Las clorofilas se documentaron por primera vez por Pelletier y Caventow en un estudio sobre el color de las hojas y más tarde fueron aislados por Sorby en 1873. Las clorofilas son los pigmentos de los organismos fotosintéticos, que incluyen las plantas, algas y algunas bacterias. Estos organismos producen más de 1×10^9 toneladas por año de clorofila, el 75% de ellos procedentes de ambientes marinos. Así, este pigmento verde está en superabundancia y ha estado en la dieta natural de los seres humanos y los animales desde tiempos inmemoriales. Como se mencionó anteriormente, la larga historia de consumo de la clorofila, y derivados de la clorofila, como componente de las verduras y frutas ha garantizado su seguridad como un componente de alimentos. Sin embargo, la estructura de la clorofila tiene una inestabilidad intrínseca, que es el mayor inconveniente para su aplicación como aditivo en productos alimenticios (Socaciu 2008).

Las clorofilas son derivados de una dihidroporfirina quelada situada con un centro de átomo de magnesio, que no contiene un anillo isocíclico y es hidrofóbico debido a que el C_{20} de alcohol isoprenoide monoinsaturado, fitol se encuentra esterificado (figura 3). Un gran número de estructuras de clorofila, han sido esclarecidas y todos tienen la misma estructura básica con las diferencias en una o más de las posiciones 3, 7, 8, 17, 18, y 20. Dos clorofilas son importantes hoy como colorantes alimentarios, clorofila a y clorofila b, estos pigmentos se obtienen de plantas de la tierra y sólo se diferencian por un CH_3 y el grupo-CHO, respectivamente, en el carbono 7 (figura 3 y 4).

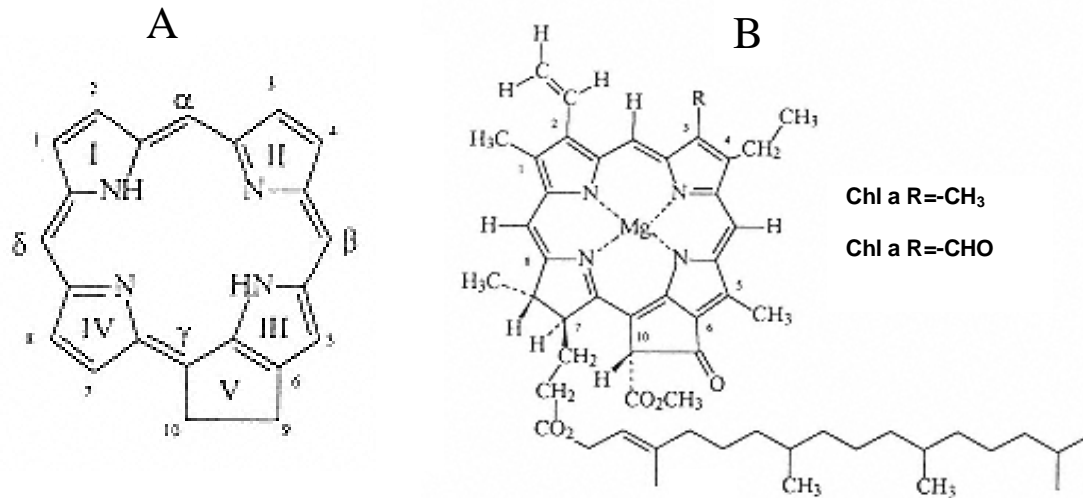
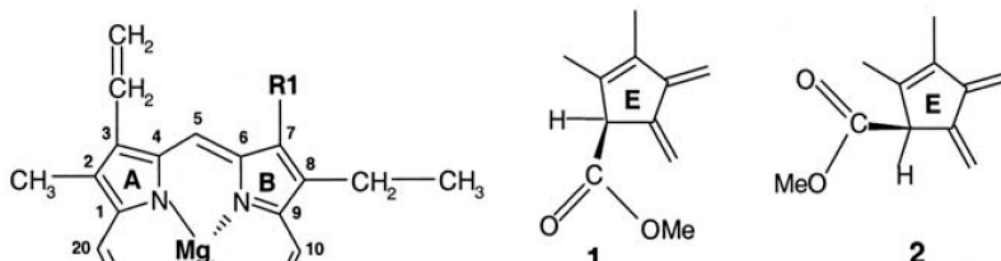


Figura 3 Estructura de porfina (A) y porfirina (B) (Delgado-Vargas 2003)

Pequeñas diferencias en las estructuras de clorofila son suficientes para producir absorción de longitudes de onda específicas y por lo tanto una gran variedad de tonos verdes. Los colores van desde amarillo-verde al azul-verde, y los derivados de estas clorofilas pueden producir naranja o, en condiciones químicas drásticas, incluso, colores rojos. Curiosamente, las plantas tienen sus moléculas de clorofila asociada con las proteínas, carotenoides y tocoferoles para darles estabilidad. La retención del color verde brillante de frutas / verduras durante el tratamiento térmico ha sido una de las principales preocupaciones de los procesadores de alimentos y de importancia económica para la industria alimentaria, porque es bien sabido que la preferencia de los consumidores es hacia las apariencias de fresca.

Las clorofilas se encuentran en las láminas de los organelos intercelulares de las plantas verdes conocido como los cloroplastos. Están asociados con los carotenoides, los lípidos y lipoproteínas a través de enlaces débiles (no covalentes) que existen entre estas moléculas, los enlaces se rompen fácilmente, por lo tanto, las clorofilas se puede extraer de la maceración de tejidos vegetales en disolventes orgánicos (Delgado-Vargas 2003).



Compuesto	Mg²⁺	R₁	R₂	Anillo isocíclico (E)
Clorofila a	+	CH	Fitol	1
Clorofila b	+	CHO	Fitol	1
Clorofila a`	+	CH	Fitol`	2
Clorofila b`	+	CHO	Fitol`	2
Clorofilida a	+	CH	H	1
Clorofilida b	+	CHO	H	1
Feofitina a*	-	CH	Fitol	1
Feofitina b*	-	CHO	Fitol	1
Feofofbida a*	-	CH	H	1
Feofofbida b*	-	CHO	H	1

Figura 4 Fórmula, sustitución y nomenclatura de las clorofilas (Socaciu, 2008).

Sin embargo, después de la cosecha de cultivos, las clorofilas se degradan en función del material vegetal y las condiciones de procesamiento. La degradación procede por la oxidación de la estructura del anillo de clorinas y en última instancia por la formación de productos incoloros y de color pardo. La degradación de la clorofila puede ocurrir dentro de unas horas o durante varias semanas la pérdida de la clorofila se ha reportado en los guisantes congelados que se relaciona a la actividad de la lipoxigenasa y la peroxidación de grasas. Diferentes metodologías se han utilizado para preservar el color verde de las

frutas y los vegetales tales como control de pH, sales, escaldado, tratamientos térmicos controlados, atmósferas modificadas y la combinación entre ellas (Delgado-Vargas, 2003).

2.4.2 Estructuras isoprénicas (carotenoides)

Los carotenoides son compuestos constituidos por ocho unidades isoprenoides (IP) (figura 5). Las unidades isoprénicas se unen en un patrón de cabeza a cola, pero el orden se invierte en el centro de la molécula de acuerdo con esta estructura, un sistema de numeración (semisistemático) ha sido asignado para el nombre de los carotenoides.

El licopeno es considerado como el primer carotenoide de color en la biosíntesis de muchos otros carotenoides naturales y lineales. Por otra parte, también es común encontrar carotenoides acíclicos, cíclicos, y entre otros. En consecuencia, la biosíntesis de los carotenoides implica muchas reacciones químicas diversas para alcanzar este tipo de estructuras.

Dos sistemas principales se han utilizado para clasificar los carotenoides (véase tabla 2): (Delgado-Vargas, 2003).

- 1.- Por sus propiedades químicas y estructura se forman dos grupos (carotenos y xantofilas).
- 2.- Por su funcionalidad se agrupan en los carotenoides primarios y secundarios.

Los carotenoides son comúnmente denominados con nombres triviales que a menudo son derivados de la fuente biológica utilizada por primera vez para su aislamiento (por ejemplo, β -caroteno fue originalmente aislados de zanahoria). Sin embargo, un mejor sistema de denominación fue desarrollado para establecer una relación entre el nombre y la estructura, en este esfuerzo, es introducida la nomenclatura semi-sistemática. En este sistema, una molécula de carotenoides se considera como dos mitades, y se le da un sistema de numeración y cada compuesto se llama como un derivado del caroteno de origen. Por otra parte, las letras griegas se utilizan para describir los grupos del final de las estructuras cíclicas y alicíclicas. Además, los prefijos y sufijos se utilizan para indicar la posición de las de hidrogenaciones y las sustituciones de los grupos como se muestra en las figuras 5 y 6.

La actividad biológica de los carotenoides se ha asociado con la capacidad de ser antioxidantes de *in vivo* e *in vitro*. Su actividad antioxidante depende de las condiciones

en las que se evalúa por ejemplo, si es un medio de reacción acuoso o lipídico, por lo tanto, la información en la literatura a veces parece contradictoria.

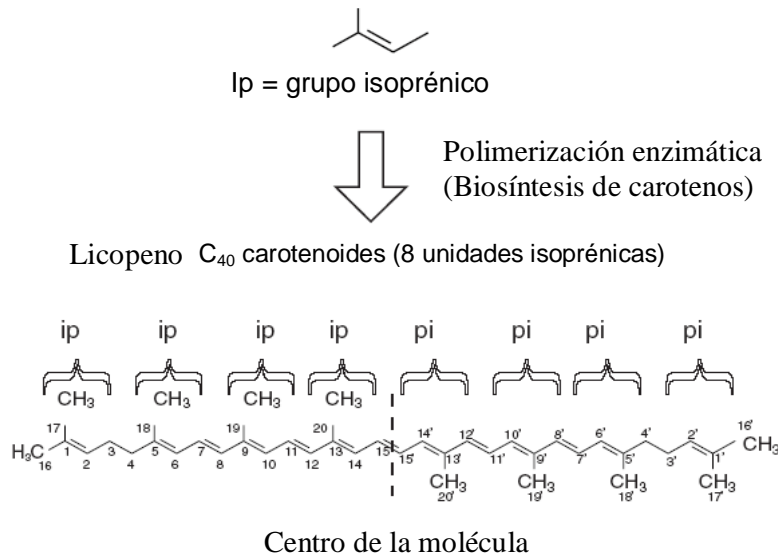


Figura 5 Estructura de los carotenoides y el sistema de numeración común. Los números cerca de cada carbono se dan de acuerdo a la nomenclatura semi-sistemática (Delgado-Vargas, 2003).

Los seres humanos han utilizado los carotenoides, para colores de productos alimenticios desde hace siglos: el azafrán, pimienta, hojas y aceite rojo de palma son algunos de los pigmentos más utilizados. Estos productos incluyen las mezclas de pigmentos y otras sustancias a menudo no identificadas, las fuentes naturales de carotenoides han persistido a través de los años y nuevos se han introducido. Como se mencionó anteriormente, los carotenoides tienen actividades biológicas muy importantes y su uso como alimento humano y animal es común en la actualidad y se recomienda en gran parte debido a sus actividades de vitamina A y antioxidante, muy importante para el mantenimiento de la salud del cuerpo.

Pero se ha llegado a asumir que el número de dobles enlaces conjugados es el parámetro más eficaz debido a que la actividad de los carotenoides aumenta a medida que el número de dobles enlaces conjugados aumenta en los carotenoides.

Los carotenoides son los biocolorantes de aplicación en la industria alimentaria por la introducción de diferentes presentaciones de estos (por ejemplo, los preparados coloidales, complejos con las proteínas) y han sido necesarios para su uso en grasas (por

ejemplo, la margarina, mantequilla) o medios acuosos (por ejemplo, bebidas, conservas, sopas).

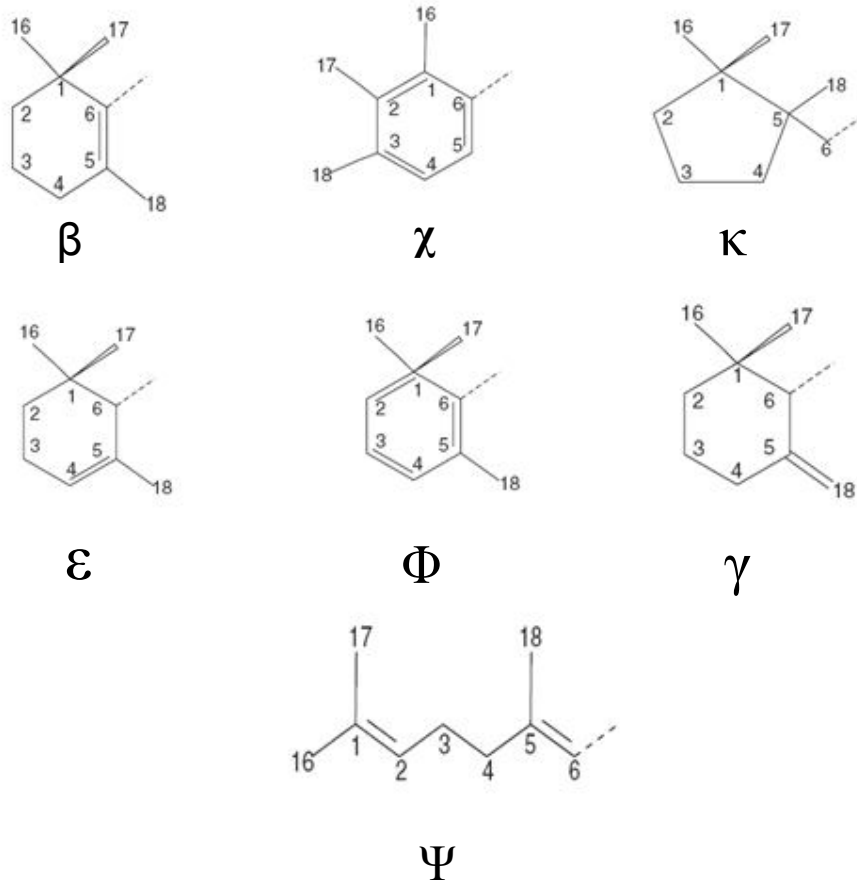


Figura 6 Estructuras de los grupos finales de los carotenoides y sus nombres (Delgado-Vargas, 2003).

Criterio de clasificación	Subgrupos y características	Ejemplos
Por elementos estructurales	<p>Carotenos: carotenoides constituidos por carbono e hidrogeno</p> <p>Xantofilas: constituidos por carbono, hidrogeno y oxigeno adicional</p>	<p>α-caroteno, β-caroteno</p> <p>luteina, fucoxantina, neoxantina</p>
Por funcionalidad	<p>Primarios: carotenoides requeridos para el proceso de fotosíntesis</p> <p>Secundarios: su presencia no esta directamente relacionada con la supervivencia de la planta.</p>	<p>β-caroteno, luteina, zeaxantina</p> <p>Carotenoides ubicados en frutos y flores α-caroteno, licopeno</p>

2.4.3 Heterociclos con nitrógeno diferentes a Tetrapirroles (Betalaínas y Betaxantinas)

Las betalaínas son los derivados del ácido betalámico, los nombres comunes de las betalaínas se asignan en relación a la planta de donde se aisló por primera vez: amarantina betacianinas-I de *Amaranthus tricolor*, betanina de *Beta vulgaris*, y gomfrenina -I de *Gomphrena globosa*, y el miraxantina *Betaxantinas* de las flores de *Mirabilis jalapa*, vulgaxantina I y II de las raíces de la remolacha roja (*B. vulgaris*), y portulaxantina de pétalos de la *Portulaca grandiflora*.

Las betalaínas se suelen clasificar en función de sus características estructurales y por lo tanto se dividen en dos grupos: betacianinas y betaxantinas con colores de rojo-púrpura y colores amarillos, respectivamente. Cuando la estructura básica es sustituida por un anillo aromático, se observa un cambio en el máximo de absorción de 540 nm (rojo-púrpura betacianinas como la betanidina) a 480 nm (amarillo betaxantinas como miraxantina-II) Más de 50 betalaínas se han descrito, todas con la misma estructura básica, y con cambios en sus grupos R1 y R2 como se ve en la figura 7, estos pueden ser hidrógenos, grupos aromáticos, u otros sustituyentes. Como se ha mencionado cada grupo de pigmentos se caracteriza por tener diferentes sustituciones en el nitrógeno principal (R1-N-R2).

El color de las betalainas es atribuible a los dobles enlaces en resonancia. Cuando la estructura básica es sustituida por un núcleo aromático, se observa un cambio en el máximo de absorción de 540 nm (rojo-púrpura betacianinas como betanidina) a 480 nm (amarillo Betaxantinas como miraxantina-II). Las betalainas están presentes en las flores o frutos y se cree que juegan un papel como atrayentes para los vectores (insectos o pájaros) en el proceso de polinización y dispersión de semillas por animales, su aparición en otras estructuras de la planta como las hojas, tallo y raíz no es funcionalmente fácil de explicar. Sin embargo, la acumulación de betalainas en la raíz de remolacha roja se ha relacionado con el almacenamiento de hidratos de carbono y como una respuesta fisiológica en condiciones de estrés (Delgado-Vargas, 2003).

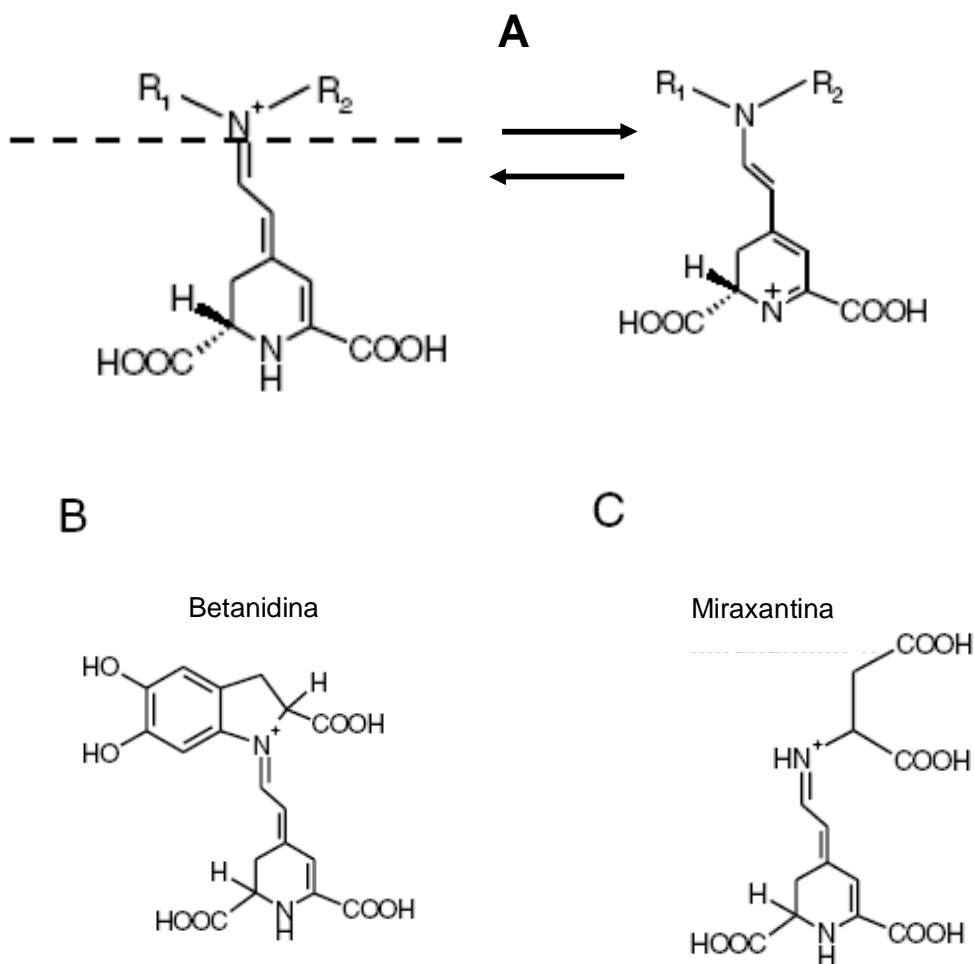
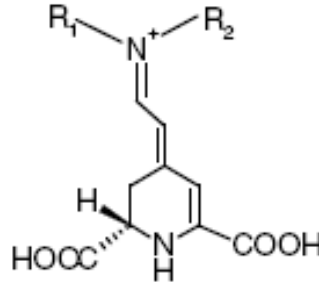


Figura 7 (A) Estructuras de resonancia de las betalainas (B) Betanidina (C) Miraxantina (Delgado-Vargas, 2003).

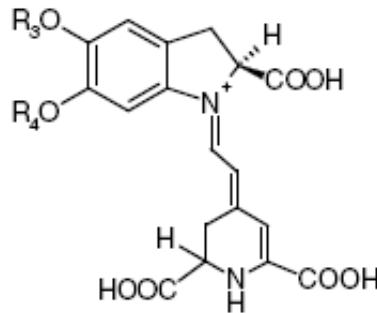
Las betalaínas se han propuesto como un mecanismo de defensa, ya que se acumulan cuando se lesionan los tejidos.

Betacianinas



Nombre	Grupo sustituyente	
Betania	R ₁	R ₂
Filocactina	β-glucosa	H
Lamparatina I	6'-O-(malonil)- β-glucosa	H
amarantina	6'-O-p(cumaril)- β-glucosa	H
Celosianina	2'-O-(β-acido glucoronico)-b-glucosa	H
	2'-O-(O _{trans} -feruloil)- β-acido glucoronico)- β-glucosa	H

Betaxantinas



Nombre	Grupos sustituyentes	
Indicanxantina	R ₁	R ₂
Portulacaxantina-I	Los dos grupos juntos de prolina	
Vulgaxantina-I	Los dos grupos juntos de hidroxiprolina	
Vulgaxantina-II	H	Glutamina
Dopaxantina	H	Acido glutámico
		L- DOPA

Figura 8 Ejemplos de Betalaínas (Delgado-Vargas, 2003).

Las betalaínas han sido utilizadas como colorantes de alimentos, al menos desde comienzos del siglo 20. La aplicación consistía en la utilización de jugo de remolacha que contenían betanina, para mejorar el color de vino tinto. Los pigmentos de la remolacha se

comercializan como concentrados de zumo (secado al vacío de 60 a 65% de sólidos totales) estos productos contenían 0,3 a 1 % de betalaínas, 75 a 80% de azúcares y 10% de proteína. El jugo de remolacha era tradicionalmente obtenido por prensado hidráulico, donde la recuperación de betalaina es inferior al 50%, sin embargo, este proceso ha sido mejorado mediante el uso de enzimas durante la maceración. Hay varios problemas que se asocian con los extractos de remolacha roja, como la gran variabilidad de color, su olor y sabor parecido al de la remolacha, así como bajos rendimientos (Delgado-Vargas, 2003).

2.4.5 Quinonas (ácido carmínico)

Las cochinillas (*Dactylopius coccus Costa*) se encuentran como parásitos en las partes aéreas de *Opuntia spp.* y *Nopalea spp.* Los colorantes de cochinilla se han utilizado desde tiempos inmemoriales en la India, Persia y Europa. Se ha establecido que el hábitat original del insecto fue México, y aunque el tinte de la cochinilla se ha utilizado en muchos países no muestra las características de calidad de la cochinilla mexicana, que fue originalmente utilizado para colorear la ropa que muestra colores rojo brillante y no como colorante para alimentos. Cortés presentó el pigmento de la cochinilla en Europa después de la conquista de México en 1518, donde la cultura azteca utilizaba este pigmento. En 1561, alrededor de 65.000 kg secos de insectos fueron enviados a España desde México. La cultura de la cochinilla se ha introducido además a otros países de América, Asia y África. Hoy en día, el Perú es el principal proveedor de los insectos secos, con una producción anual de cerca de 400 toneladas, casi el 85% de la producción mundial, seguido por México y las Islas Canarias.

La cochinilla hembra se separa justo antes de la puesta de huevos, momento en que los insectos secos pueden contener hasta un 22% de ácido carmínico. Los insectos son secados y el extracto obtenido a partir de los cuerpos desecados; alrededor de 80.000 a 100.000 insectos son necesarios para producir 1 kg de colorante. Originalmente, la extracción del pigmento se llevó a cabo con agua caliente para obtener un producto conocido como "extractos simples de la cochinilla." En la actualidad, la extracción se lleva a cabo con etanol y se obtiene una solución de color rojo. El alcohol es eliminado, lo que resulta en una solución concentrada de 2 a 4% de ácido carmínico que es el compuesto colorante principal (Delgado-Vargas, 2003).

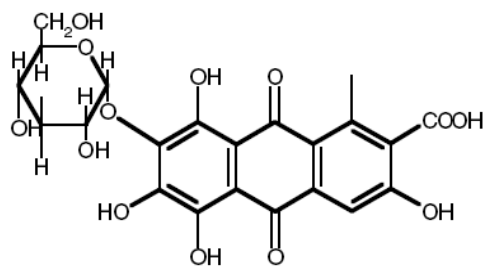


Figura 9 Estructura del ácido carmínico (Socaciu, 2008).

El ácido carmínico es hidrosoluble, pero tiene la capacidad de reaccionar con una variedad de metales que forman pigmentos insolubles en agua llamados carmines. En particular, los carmines término que se utiliza en los Estados Unidos para diseñar el calcio o calcio-laca de aluminio del ácido carmínico.

Tabla 3 Características de los pigmentos de grana cochinilla (Delgado-Vargas, 2003).

Acido carmínico	Carmín
Soluble en agua	Insoluble en agua
Estable a calor y luz	Estable luz y calor
Naranja con un pH inferior a 5 y más de 8 se convierte en color rojo azulado	Una variedad de tonos se obtienen de color amarillo-rojo a casi azul
Se utiliza solo o en combinación con otros tintos en todo tipo de alimentos, bebidas, jaleas y conservas, entre otros	Se utiliza para producir cualquier tipo de alimento que se necesita el rojo como en las carnes, salsa de tomate en conserva de pescado, en helados, pizzas, yogures, y surimi, entre otros

La cochinilla y sus derivados están resurgiendo hoy como colorantes alimentarios a causa de sus propiedades superiores tecnológicas (estabilidad, claridad y color deseable) y la influencia de la tendencia natural. Las lacas carmines son más rentables como colorantes que el ácido carmínico y tienen los tonos de color similares a los obtenidos con los productos sintéticos 4R y amaranto. Además, la estabilidad es buena en virtud de la exposición a la luz, pero se reduce en presencia de calor, el pH, el aire, y la irradiación. Además, los colorantes carmín son resistentes a la oxidación y no se ve afectado por SO₂. Las presentaciones comerciales incluyen un secado por aspersión en forma de maltodextrina o preparados con propilenglicol, glicerina, ácido cítrico y citrato de sodio. En la aplicación de los pigmentos de la cochinilla, debe considerarse que el color carmín no tiene una relación directa con el contenido de ácido carmínico, por lo que se sugiere que el color debe ser la herramienta para seleccionar y asignar el nivel de calidad a carmin. La legislación del Codex permite el uso de carmines en productos de panadería, con el

nivel establecido por las BPM. Los pigmentos de carmín de cochinilla se permiten como colorantes de alimentos en los Estados Unidos y los niveles comunes están en el rango de 0,05 a 1,0% (Socaciu, 2008).

2.5 Benzopiranos (Antocianinas)

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

Las antocianinas son el grupo más numeroso de pigmentos hidrosolubles extendidos en el reino vegetal, son responsables de los colores exhibidos por muchas flores, frutas y hojas. Estos pigmentos naturales son usualmente asociados con frutas rojas aunque también se encuentran en verduras, raíces, legumbres y cereales (Betchold, 2009).

2.5.1 Distribución

La estructura de las antocianinas produce una gran gama de colores del rojo al azul que están claramente representados en flores y frutos, aunque también están presentes en las hojas y los órganos de almacenamiento. Las antocianinas son comunes en las plantas superiores, pero están ausentes en algunas plantas inferiores como las algas. En la naturaleza, es posible encontrar plantas con un tipo principal de antocianina, esta gama de la variabilidad también es común en plantas utilizadas como fuente de alimento. En general, la concentración de antocianinas en la mayoría de las frutas y hortalizas oscila desde 0,1 hasta 1% de peso seco (ps). La más extendida de las antocianinas es la cianidina ya que se encuentra en cantidades superiores a 10% de la antocianina total contenido en 39 de 44 diferentes frutas como se observa en tablas 4 y 5.

Tabla 4 Antocianinas encontradas en diferentes tejidos de plantas (Delgado-Paredes 2003).

Flores	Antocianinas
<i>Billbergia buchholtzii</i>	Mv 3,5-diglucosido
<i>Camellia japonica</i> cvs.	Cy 3-glucosido
<i>Commelina communis</i>	Dp 3-(6"-p-coumaril glucosido)-5-(6"-malonilglucosido)
<i>Portea metropolitana</i>	Cy, Mv 3,5-diglucosides
<i>Tradescantia</i> Spp	Tricafeil Dp 3,7,3'-triglucosido
<i>Dahlia cultivars</i>	Pg, Cy 3-(6"-malonilglucosido)-5-glucosido, Pg,Cy 3,5-di(malonil)glucosido.
<i>Gladiolus cultivars</i>	Cy, Dp, Mv, Pg, Pn, Pt 3-ramnosilglucosido-5-glucosidos
Frutas	
<i>Panax ginseng</i>	Pg 3-glucosido
<i>Persea americana</i>	Cy 3-galactosido, 3,5-diglucosido-p-Coumarato.
<i>Sambucus nigra</i>	Cy 3-glucosido-3-sambubiosido, 3-sambubiosido-5-glucosido,3,5-diglucosido, 3-xylosylglucosido, 3-rhamnosilglucosido
<i>Olea europea</i>	cvs. Dp 3-rhamnosilglucosido-7-xylosido, Cy 3-rutinosido
<i>Beta vulgaris</i>	Cy, Pn, Pt 3-glucosidos
Hojas	
<i>Alocasia</i> spp.	Cy 3-rutinosido
<i>Zizania aquatica</i>	Cy 3-glucosido, 3-rhanosilglucosido
<i>Epimedium</i> spp.	Cy 3-(p-coumarilsoporosido)
<i>Cichorium intybus</i>	Cy 3-(6"-malonilglucosido)
<i>Ananas cosmosus</i>	Cy 3,5,3'-triglucosido, Cy, Pn 3,5-diglucosidos
Tallo	
<i>Asterostigma riedelianum</i>	Cy 3-rutinosido, 3-glucosido
<i>Pinellia tripartita</i>	Cy 3-rutinosido
<i>Solanum scabrum</i> spp. scabrum	Mv, Pt glicosidos
<i>Polygonum</i> spp.	Cy 3-glucosido, 3-galactosido, 3-arabinosido, 3-rutinosido, 3-arabinosilglucosido, Cy, Pn 3-arabinosido-5 glucosidos, Mv 3,5-diglucosido

Las antocianidinas correspondientes Cy = cianidina, Dp = delphinidina, Mv = malvidina, Pg = pelargonidina, Pn = peonidina, y Pt = petunidina

Tabla 5 Ocurrencia de antocianinas en algunas fuentes naturales que se utilizan como alimentos
(Delgado-Paredes, 2003)

Cebolla roja	<i>Alium cepa</i>	Cy 3-glucosido and 3-laminariobiosido, No acilado y acilado con ester malonil Cy 3-galactosa and 3-glucosido; Pn 3-glucosido
Higo	<i>Ficus spp.</i>	Cy 3-glucoside, 3-rutinoside y 3, diglucosido, Pg 3-rutinosido
Fresa	<i>Fragaria spp.</i>	Pg y Cy 3-glucosidos
Semilla de soya	<i>Glycine maxima</i>	Cy y Dp 3-glucosidos
Papas moradas	<i>Ipomoea batatas</i>	Cy y Pn 3-soforosido-5-5- glucosidos acilado con esterres feruil y cafeoil
Mango	<i>Mangifera indica</i>	Pn 3-galactosido
Fruta de la pasión	<i>Passiflora edulis</i>	Pg 3-diglucosido, Dp 3-glucosido
Ciruela	<i>Prunus domestica</i>	Cy y Pn 3-glucosidos y 3- rutinosidos
Arandanos	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Cy y Pn 3-galactosidos, 3- arabinosidos y 3-glucosidos
Uvas	<i>Vitis spp.</i>	Cy, Pn, Dp, Pt y Mv mono y diglucosidos, libres y acilados
Maíz azul	<i>Zea mays</i>	Cy, Pg y Pn 3-glucosidos y Cy 3- galactosido, libres y acilados

Las antocianidinas correspondientes Cy = cianidina, Dp = delfinidina, Mv = malvidina, Pg = pelargonidina, Pn = peonidina, y Pt = petunidina

2.5.2 Biosíntesis

Los precursores de las antocianinas se producen por la vía glucolítica (fosfoenolpiruvato) y la vía de las pentosas-fosfato / ciclo de Calvin (eritrosa-4-fosfato). Estos compuestos son los componentes básicos del ácido shikímico, que junto con las formas de acetato de las formas aromáticas primarias dan lugar a la formación de muchos compuestos fenólicos, incluyendo a las antocianinas. Dos partes principales constituyen la ruta de

biosíntesis de antocianinas: (1) los precursores del metabolismo de fenilpropanoides general, y (2) pasos concretos hacia la biosíntesis de flavonoides. En la primera parte, en la vía metabólica del shikimato se utiliza para producir varios ácidos orgánicos tales como cinámico, p-cumárico, cafeico, ferúlico, clorogénicos y la fenilalanina, esta a su vez se convierte en p-coumaryl-CoA en un proceso que involucra tres enzimas: PAL, cinamato-4-hidroxilasa (C₄H), y la ligasa 4-coumaryl-CoA reductasa (4cl). La p-Coumaril-CoA es el principal precursor de los flavonoides de la lignina y de los ácidos fenilpropanoides. De ahí, otros ácidos p-cumáricos se utilizan para construir los anillos C-6-C-3 (los anillos B aromáticos y los carbonos correspondientes al anillo C) que son parte de la estructura básica de flavonoides. En la segunda parte, la sintasa-chalcona (CHS), que se considera la enzima clave en la biosíntesis de flavonoides (Delgado-Paredes 2003) la cual cataliza la condensación de tres moléculas de malonil-CoA con 4-cumaril-CoA para formar las chalconas intermedias. Haciendo la deducción de la ruta metabólica, la acetil-CoA proporcionara el anillo A y el oxígeno del anillo de pirano central a través del malonil-CoA. Para dilucidar las etapas iniciales de la biosíntesis de antocianinas, las células indiferenciadas de perejil, maíz, boca de dragón y petunia han sido utilizadas. En el paso siguiente, la chalcona es isomerizada a naringenina por la enzima isomerasa-chalcona (CHI), en una reacción estereoespecífica, la naringenina (una flavanona) es un precursor de los flavonoides y los isoflavonoides. Siguiendo el curso de la ruta metabólica, una mono-O-di-oxigenasa (dependiendo del tejido) se utiliza para convertir en naringenina dihidrokaempferol (flavona), que es convertida por F3 'H y F3' 5 'H en dihidroquercetina y dihidromiricetina, respectivamente. En la reacción siguiente, la dihidroflavonol-4-reductasa (DFR) cataliza la conversión de dihidrokaempferol, dihidroquercetina y dihidromiricetina en leucoantocianidinas, en una reacción NADPH o NAD-dependiente. Más adelante en la vía, las leucoantocianidinas se transforman en las antocianidinas de colores, esta reacción implica pasos de oxidación y algunos de deshidratación; a la actividad enzimática asociada en estas reacciones ha sido llamado sintasa-antocianidina (ANS). Una vez realizadas estas reacciones las antocianidinas formadas en los pasos anteriores se convertirán, en antocianinas por reacciones de glicosilación. Para esta reacción, la enzima mejor caracterizada es la UDP-glucosa/flavonoide-3-O-glucosil-transferasa (GT) (Delgado-Paredes 2003). Las glicosil-transferasas son muy específicas en relación con el sustrato, tanto para la posición y el azúcar a transferir.

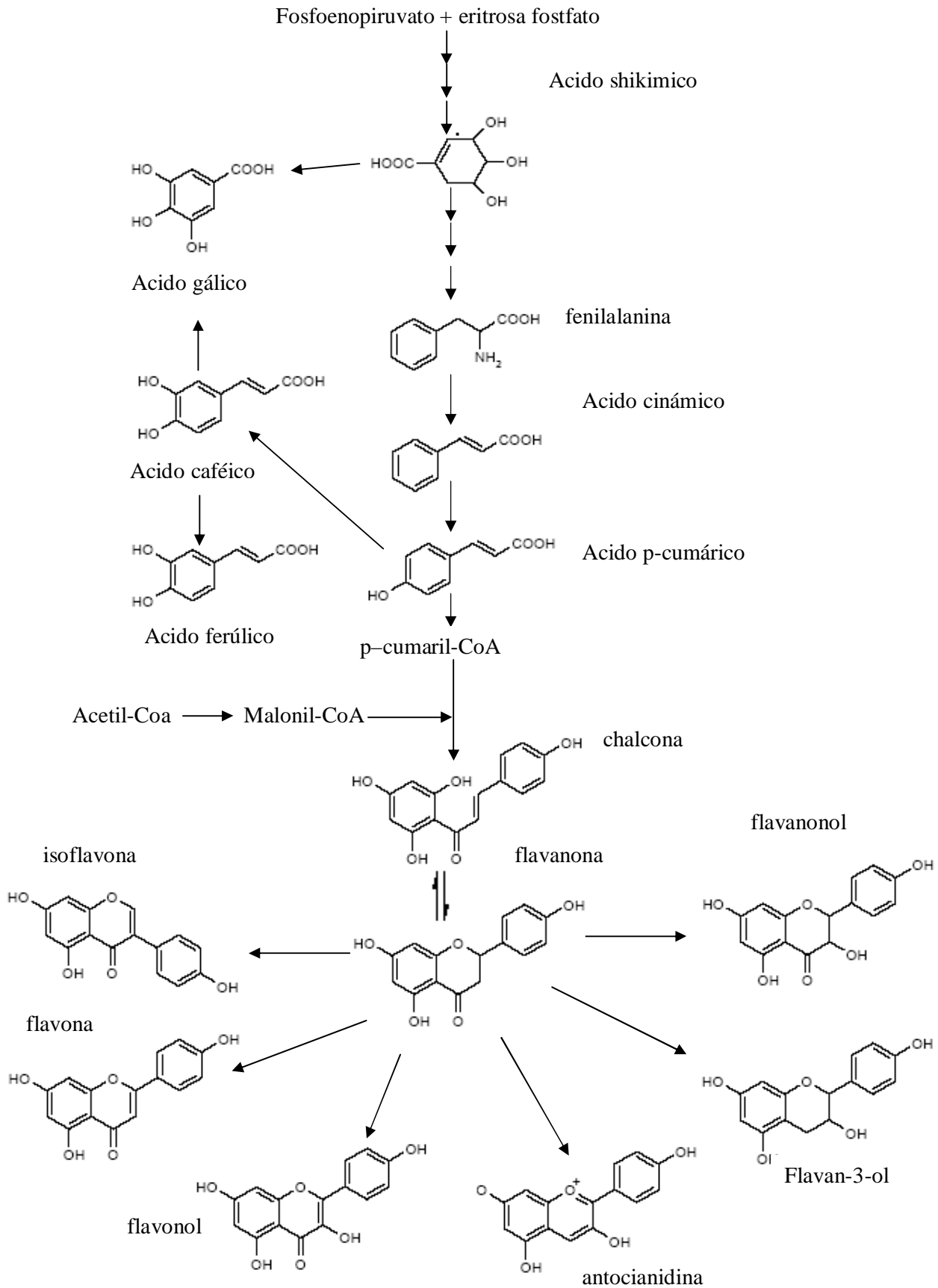


Figura 10 Biosíntesis de las antocianinas en maíz (Cuevas, 2008).

Y debido a esto, se espera que un gran número de estas enzimas se encuentren durante la glicosilación. Ya ha sido reportada la caracterización de una glicosiltransferasa que cataliza la transferencia de un azúcar (p.ej. galactosa). En un estudio con un cultivo en suspensión de células de *Daucus carota L.* se ha demostrado la presencia de una galactosa/galactosiltransferasa cianidina (GCT) y la actividad de una xilosiltransferasa, además, se ha sugerido que actúan en las reacciones de la secuencias de la glicosiltransferasa otro ejemplo es la UDP-galactosa/flavonoide-3-O-glicosiltransferasa se caracterizó en manzana; esta enzima cataliza la transferencia de los grupos galactosil a cianidina, y curiosamente es relativamente alta en los cultivares amarillo y verde, lo que indica la importancia de regulación (Delgado-Paredes 2003). En relación a la metilación, han sido propuestas como una medida tardía la participación de flavonoides O-metiltransferasas (MT) las cuales también tienen una alta especificidad por lo que las metilaciones múltiples requieren múltiples enzimas. Por último, la acilación de antocianinas implica a las acil-transferasas que igualmente son muy específicas; estas reacciones, en algunos casos estas preceden a las glicosilaciones. Las reacciones de transferencia son comunes para el ácido cumárico o ácido cafeico, pero la transferencia de ácido succínico no es tan común. Sin embargo, una aciltransferasa, aislada de flores de color azul de *Centaurea cyanus*, cataliza la transferencia de la fracción de succinil succinil-CoA a 3-glucósidos de cianidina y pelargonidina, pero no a 3,5-diglucosidos. Por otra parte, esta enzima también cataliza la malonilación a tasas similares de succinilación (Delgado-Paredes 2003).

2.5.3 Estructura

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

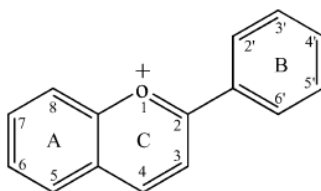


Figura 11 Estructura ión flavilio (Rein, 2005).

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

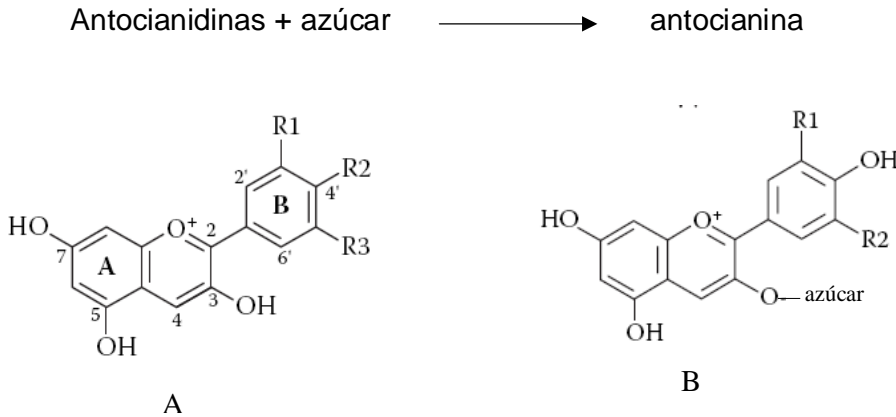


Figura 12 (A) estructura de antocianidina y (B) una antocianina (Betchold, 2009)

2.5.4 Factores que afectan la estabilidad de la estructura

2.5.4.1 Glicosilación

Como se ha mencionado, para obtener una antocianina, la antocianidina debe estar combinada con al menos una molécula de azúcar; así las antocianinas están también clasificadas por el número de moléculas de azúcar en sus estructuras (e.g., monosidos, biosidos, trisidos).

Se podría pensar que la diversidad de las antocianinas sea asociada con el número de azúcares encontrados en la naturaleza pero las antocianinas glicosiladas están unidas principalmente con glucosa, ramosa, xilosa, galactosa, arabinosa y fructosa, siendo la glucosa la que mas se encuentra en las fuentes de antocianinas. La glicosilación confiere solubilidad y un cierto grado de estabilidad en estos compuestos. La estabilidad de color de cianidina es más alta que la de malvinidina, pero más baja que la de malvinidina 3-glucósido (Rein, 2005). Ciertamente los glicósidos afectan la estabilidad, pero es el lugar del glicósido el que influencia mayormente la estabilidad de las antocianinas. En un estudio de isómeros de los glicósidos de pelargonidina, la glicosilación en C-3 produjo la antocianina más estable sobre 5,7, y 4 (Rein, 2005).

Otro factor que afecta la estabilidad es el tipo de unidades del glicósido en las antocianinas. Las antocianinas del arándano rojo y agrio con galactosa fueron más estables que con arabinosa durante el almacenamiento. La vida media de cianidina 3-rutinosido es 65 días en la solución del amortiguador de pH 2.8 a temperatura ambiente, donde la vida media de la antocianidina correspondiente, cianidina, es de 12 horas, también se ha reportado que las antocianinas que contienen disacáridos, por ejemplo la que contenía el disacarido sambubiosa, fue más estable que la antocianina con glucosa. Esto no solo se observa en la estabilidad si no que los sustituyentes también afectan el color percibido de las antocianinas, las antocianinas 3-glucósido han sido encontradas más coloridas que los que corresponden a las 3,5 y 5' glucósido ya que el incremento en el número de glucosas incrementa los colores amarillos (Rein, 2005).

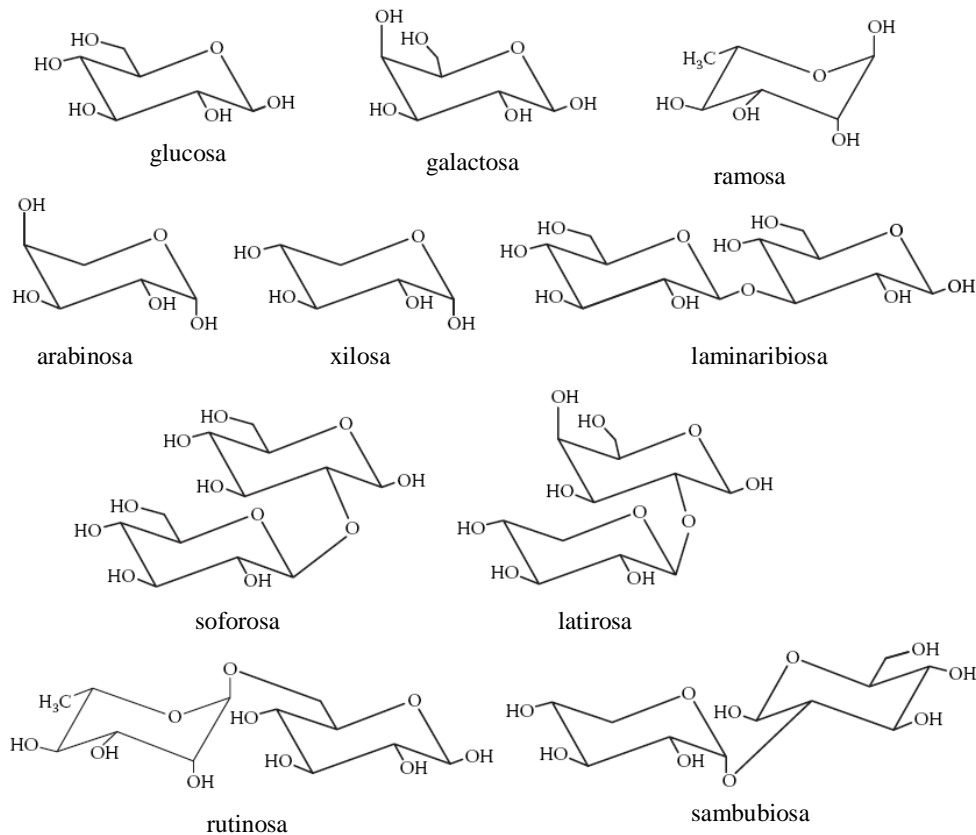
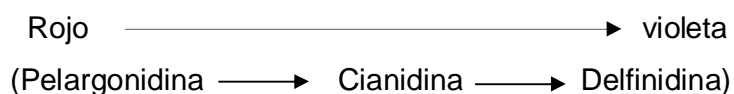


Figura 13 monosacáridos y disacáridos que generalmente se encuentran junto con las antocianinas en los alimentos (Socaciu, 2008).

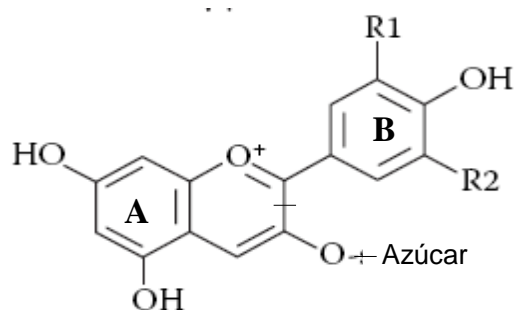
2.5.4.2 Hidroxilación y metoxilación

Según el grado de hidroxilación y metilación que se encuentren en el anillo B, el color dominante de la antociana se diferencia de naranja (pelargonidina) hacia el violeta (delfinidina) esto es que sus características cromáticas son afectadas de manera importante por el patrón de sustitución del anillo B como se ve en la figura 14.

Por ejemplo, el incremento del patrón de hidroxilación da como resultado un cambio batocrómico es decir que la longitud de onda de absorción se desplaza hacia longitudes de onda más grandes o de menor energía por efecto los sustituyentes de rojo hacia un color violeta (Escribano-Bailon et.al. 2004).



Esto no solo se refleja en el color sino también en la estabilidad, conforme aumentan los metoxilos la estabilidad aumenta y conforme los hidroxilos aumentan, la estabilidad disminuye. Así, entre las antocianinas, la más estable es malvinidina, seguido por peonidina, petunidina, cianidina y delfinidina (Rein, 2005).



Nombre	R ₁	R ₂
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	H
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvinidina	OCH ₃	OCH ₃

Figura 14 Estructura química de las principales antocianinas (Cuevas, 2008).

Más del 90 % de todas las antocianinas aisladas en la naturaleza se basan sólo en las siguientes seis antocianidinas: Pelargonidina (plg), cianidina (cyd), peonidina (pnd), delphinidina (dpd), petunidina (ptd), y malvidina (mvd), tal como se muestra en la figura 14 están diferenciados por el patrón de sustitución en el anillo B (Socaciu 2008).

2.5.4.3 pH

Las antocianinas son más estables en un medio ácido con valores bajos de pH que en soluciones alcalinas con valores altos de pH. Sin embargo, las antocianinas son conocidas por mostrar una gran variedad de variaciones de color en el rango de pH de 1-14. La naturaleza iónica de antocianinas permite los cambios de la estructura en la molécula de acuerdo con el pH predominante, lo que resulta en diversos colores y matices en los diferentes valores de pH.

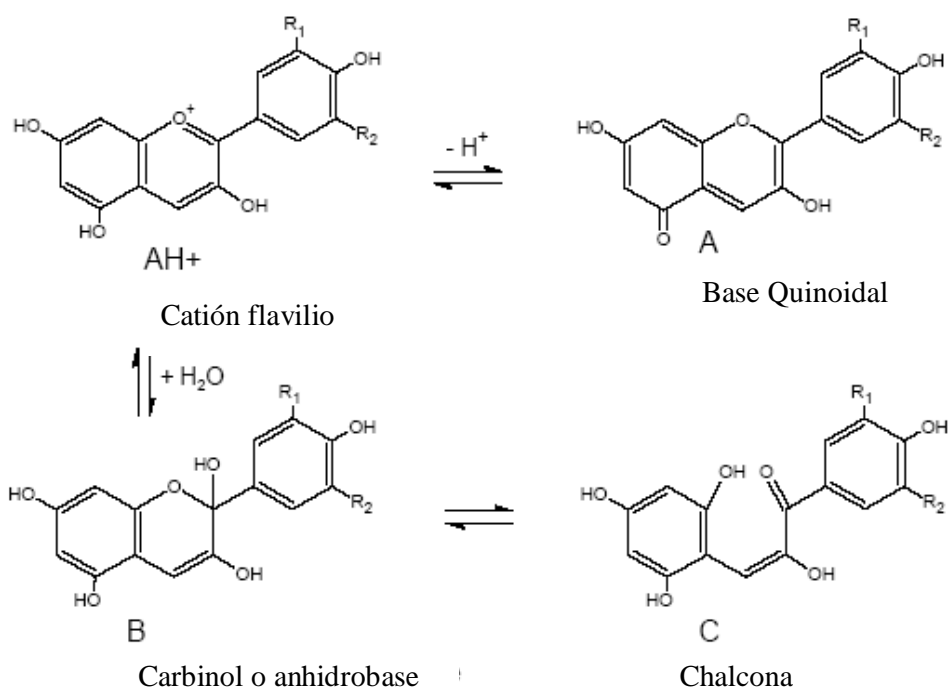
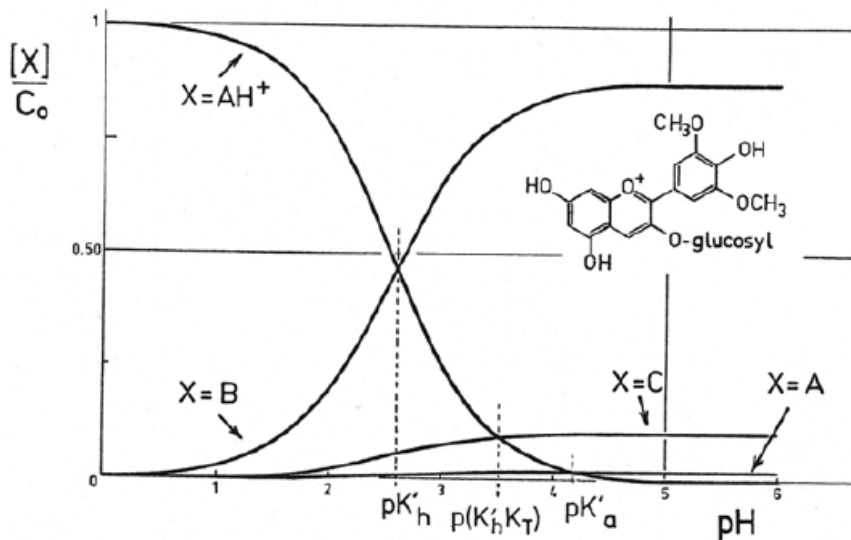


Figura 15 Las cuatro principales formas de equilibrio de antocianinas existentes en medios acuosos (Rein, 2005).

En soluciones acuosas ácidas las antocianinas existen como cuatro especies de equilibrio principales: la base quinoidal A, el cation flavilio AH^+ , el B carbinol o pseudobase, y la C chalcona. En un medio muy ácido (pH 0,5) el cation flavilio rojo es la única especie de

equilibrio que predomina. El aumento del pH ocasiona disminución de la intensidad en el color y la concentración del catión flavilio, ya que es hidratado por ataque nucleofílico de agua, a la forma carbinol incoloro. La forma carbinol ha perdido su doble enlace conjugado entre el anillo A y B y por lo tanto no absorbe la luz visible. También una pérdida rápida de protones del catión flavilio tiene lugar cuando el pH es mayor y la forma colorida quinonoidal aumenta. Cuando el pH aumenta aún más, la forma carbinol desaparece, a través de la apertura del anillo, y se forma la charcona amarilla menos colorida. Las cantidades relativas de cada forma en equilibrio varían en función del valor del pH y de la estructura de la antocianina.

La forma quinonoidal es la única especie de color existentes de pH 5, pero que existe en un porcentaje despreciable y no afecta el color general de la solución de forma notable (Rein, 2005).



A) Base Quinonoidal), B) o Carbinol anhidrobase; C) Chalcona

Figura 16 Distribución de las diferentes formas de equilibrio malvinidina-3-glucósido de acuerdo al pH +AH) catión flavilio (Rein, 2005).

La pérdida de color de antocianinas, como lo entendemos nosotros, depende del pH por el equilibrio de las cuatro formas de antocianinas, de los cuales AH^+ , el catión flavilio, es el más estable y la mayoría de las especies son de color. El catión flavilio existe, en un medio ácido, y el equilibrio de las especies dominantes en los medios alcalinos se degrada aún más fácil y rápido como se observa en la figura 16. La importancia del pH en

el color de las antocianinas, se observa en la intensidad del color, en valores de pH bajo en comparación con el valor de pH superior. Por lo que si el pH no favorece a la forma del ión flavilio, se pierde el color. Hay varias maneras de afectar a la estabilidad del color de la forma flavilio en vivo o en los productos alimenticios a valores de pH cercano a neutro, por las diferentes interacciones que puede haber en estas matrices. El color en una solución alcalina puede ser revertido al cambiar el valor de pH de nuevo a ácido. En tal caso, las formas en equilibrio de las antocianinas regresan hacia la forma del ión flavilio y el color rojo predomina. Sin embargo, cuando se llega a la forma de chalcona y si el valor de pH es demasiado alto y las chalconas ya se han formado, esta reviración de color no se puede realizar más (Rein, 2005).

2.5.4.4 Temperatura

La estabilidad de las antocianinas también se ve afectada por las temperaturas altas (>40°C). La tasa de degradación de antocianinas puede aumentar durante el procesamiento y almacenamiento de las fuentes que se utilizan como alimentos, si se aumenta la temperatura en los valores de pH 2-4 se induce la pérdida de las mitades de glicósido de las antocianinas, por hidrólisis del enlace glucosídico (Rein, 2005). Esto conduce a una mayor pérdida de color de antocianinas, ya que las agliconas son mucho menos estables que sus formas glucosídicas. Se ha postulado que la formación de una chalcona es el primer paso en la degradación térmica de antocianinas. La degradación térmica conduce a productos marrón, especialmente en presencia de oxígeno en donde la degradación térmica de antocianinas sigue una cinética de primer orden, combinando alta temperatura, y un pH elevado la degradación de los antocianos resulta en tres diferentes derivados del ácido benzoico también trihidrobenzaldehido ha sido identificado como un producto final de la degradación térmica de antocianinas (figura 17) (Rein, 2005).

Pero en general, los mismos factores estructurales, que aumentan la estabilidad, también aumentan su estabilidad térmica.

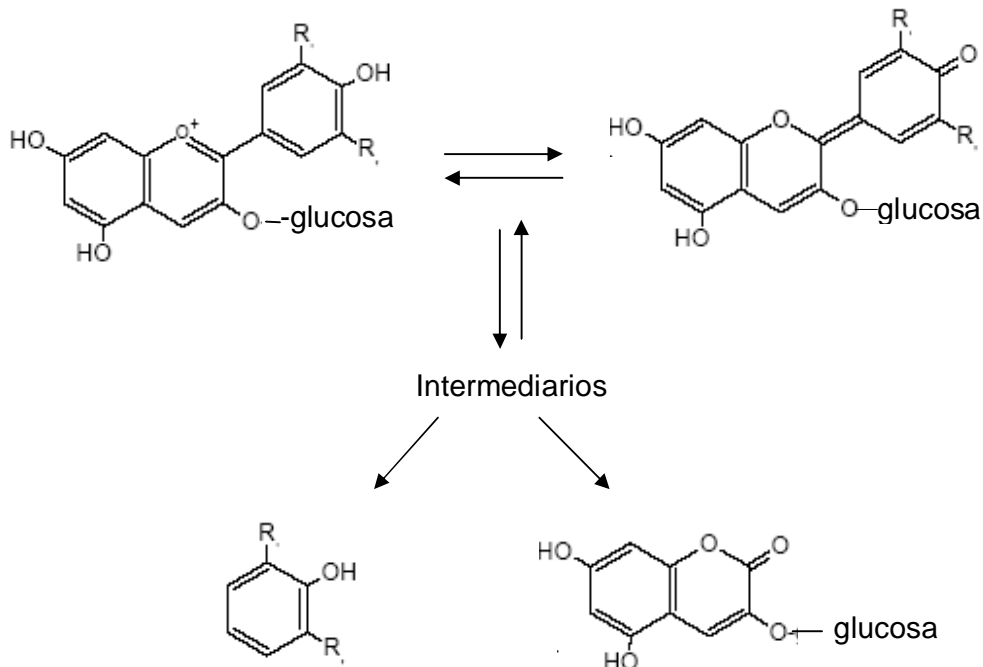


Figura 17 La degradación de los antocianos monoglucósido a pH 3,7 acelerada por el calor (Rein, 2005).

2.5.4.5 Luz

La luz afecta antocianinas en dos formas diferentes. La luz es esencial para la biosíntesis de antocianinas, y también acelera su degradación. Las antocianinas conservan su color mucho mejor cuando se mantienen en la oscuridad. La diferencia se observa en ensayos después de 24 horas, cuando las antocianinas fueron almacenadas en la luz y en la oscuridad a temperatura ambiente en un pH de 2,3 utilizando bebidas carbonatadas con antocianinas de la uva perdiendo sólo el 30% de antocianinas cuando se mantenían en la oscuridad, y en la exposición a la luz el 50% de los pigmentos se perdieron. La pérdida de antocianinas más vigorosa (70%) se observó bajo luz fluorescente con la temperatura de almacenamiento ligeramente elevada, se encontró que los productos finales de la degradación inducida por la luz de las antocianinas eran los mismos que en la degradación térmica, sin embargo, la vía cinética de la reacción fue diferente, lo que implica la degradación de la excitación del catión flavilio (Rein 2005).

2.5.5 Oxígeno

El oxígeno amplifica el impacto de otros procesos de degradación de antocianinas. La presencia de oxígeno, junto con la temperatura elevada, son las combinaciones más perjudiciales de muchos factores probados contra el deterioro de diferentes antocianinas. El oxígeno junto con el ácido ascórbico también se encontró perjudicial para la estabilidad de antocianinas. El oxígeno induce a inestabilidad en las antocianinas y combinado con el pH, ya que si aumentara el pH, la degradación de antocianinas es mayor en presencia del oxígeno. La degradación de las antocianinas por la luz depende del oxígeno molecular. El efecto nocivo del oxígeno en las antocianinas puede tener lugar a través de un mecanismo oxidativo directo y/o a través de la oxidación indirecta, donde los componentes oxidados de los medios de reacción con más antocianinas dan lugar a productos sin color o color marrón (Rein, 2005). Las antocianinas reaccionan también con los radicales de oxígeno, es decir, peroxi-radicales. En tales reacciones, las antocianinas actúan como antioxidantes, y por esta característica de las antocianinas se consideran un contribuyente a la salud contra las enfermedades cardiovasculares (Rein, 2005).

2.5.6 Enzimas

La inactivación de las enzimas mejora la estabilidad de antocianinas. Las enzimas más comunes que degradan antocianinas son las glucosidasas, que rompen el enlace covalente entre los residuos glicósidos y la aglicona de una antocianina, lo que resulta en la degradación de la antocianina con la formación de la antocianidina altamente inestable. Las peroxidasas y fenolasas, tales como las fenol-oxidasas y las polifenol-oxidasas, ambas se encuentran de forma natural en frutas y bayas, por lo cual estas enzimas también son comunes en la degradación de antocianinas.

Las fenolasas pueden reaccionar directamente con antocianinas, pero la destrucción de las antocianinas es mucho más eficiente cuando otros compuestos fenólicos, como el catecol y ácido caftarico están presentes. Sin embargo, se ha demostrado por ejemplo que no hubo degradación con malvidina 3-glucósido por la polifenol oxidasa, sino sólo en presencia de ácido caftarico (Rein, 2005).

En la degradación enzimática de las antocianinas, las quinonas juegan un papel importante. Primeramente, las enzimas oxidan a otros compuestos fenólicos en sus

correspondientes quinonas y hasta entonces reaccionan con los antocianos que resulta en la degradación de antocianinas, lo que conduce a productos de condensación marrón. Esto se ha observado en muchos estudios con los antocianos puros, al igual que pelargonidina 3-glucósido y cianidina 3-glucósido, con soluciones modelo de vino y con los productos de las bayas moradas (Rein, 2005).

De todas las estructuras de las antocianinas, la estructura de carbinol es la más susceptible a la oxidación enzimática. Por lo tanto, la estructura de las antocianinas se ve afectada por la actividad enzimática. Por ejemplo, los glucósidos de malvidina son más estables que los glucósidos de delphinidina contra la polifenol oxidasa. También se ha observado que la cianidina reacciona directamente con polifenol oxidasa, pero la pelargonidina no reacciona en absoluto (Rein, 2005).

2.5.7 Interacción con metales

Los complejos de metales son de poco interés para la industria alimentaria debido a la contaminación no deseada de los productos alimenticios por los metales, y por lo tanto, sólo se mencionara brevemente aquí. Las muchas variaciones de color de las flores se deben a la formación de complejos entre el metal (azul quelados) con las sales de flavilio rojo como se observa en la figura 18.

Los metales más comunes en los complejos de antocianinas son el estaño (Sn), cobre (Cu), hierro (Fe), aluminio (Al), magnesio (Mg) y potasio (K). Las antocianinas que únicamente se han utilizado son cianidina, delphinidina y petunidina, que tienen más de un grupo hidroxilo libre en el anillo B, son capaces de quelación de metal (Rein, 2005).

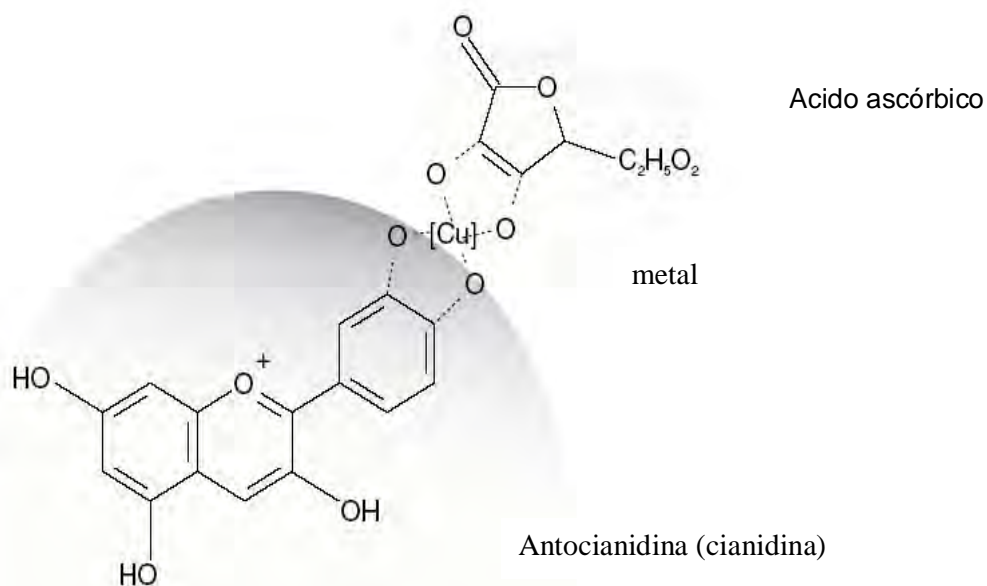


Figura 18 Mecanismo sugerido para la formación del complejo metal-antocianina-acido ascórbico (Delgado-Vargas, 2003)

2.5.8 Efecto de la concentración

La concentración aumentada de la antocianina promueve mayor estabilidad de color. Por ejemplo, la estabilidad de color del jarabe de fresa fue mejorada aumentando la concentración de antocianinas. La concentración total de la antocianina fue más importante en relación a la estabilidad de color que los diferentes tipos de antocianinas individuales. Por lo tanto, al aumentar el contenido de antocianinas mejora su estabilidad a través de la auto-asociación, factor que se explica en los siguientes puntos.

2.6 Copigmentación

El color de las antocianinas puede ser estabilizado y mejorado por las reacciones de copigmentación, (como en las vacuolas de plantas, las antocianinas libres deben ser incoloras en las condiciones imperantes en los pH ligeramente ácidos). Dado que las antocianinas son, sin embargo coloridas en la naturaleza, sus formas de color deben ser fuertemente estabilizadas por otros componentes naturales, a esto se le llama copigmentación y se presenta en las células de flores, frutas y bayas.

La copigmentación puede tener lugar a través de varias interacciones. Los mecanismos más importantes de copigmentación son las interacciones intermoleculares y la formación de complejos intramoleculares, como se observa en la figura 19. La libre asociación y la formación de complejos metálicos son también los medios posibles a través del cual se produce copigmentación.

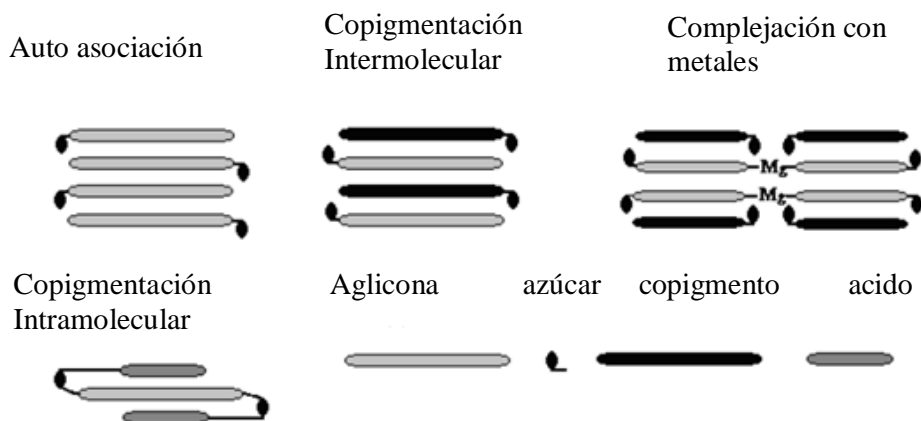
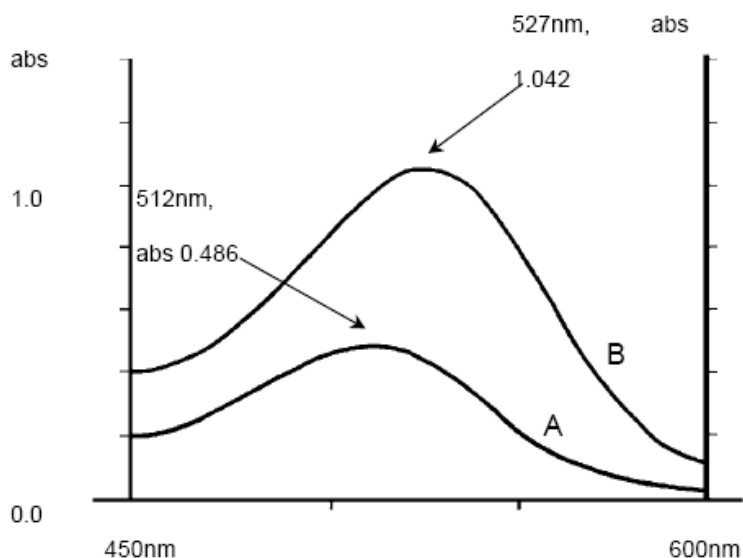


Figura 19 Interacciones de copigmentación en las antocianinas (Rein, 2005).

Los fenómenos de copigmentación se observan como un cambio batocrómico ($\Delta \lambda\text{-max}$), es decir, el cambio de la longitud de onda de máxima absorción (λmax), en el rango visible hacia una mayor longitud de onda, que también se llama el efecto azulado, ya que el color da un cambio en las antocianinas de rojo a azul a través de la copigmentación, o como un efecto hiperocrómico (ΔA), en la que la intensidad de un color de antocianinas (A) es reforzada por copigmentación. Tanto el catión flavilio y la base quinoidal desempeñan un papel en el cambio batocrómico, pero el efecto hiperocrómico se logra sólo con la estabilización de la última. La figura 20 muestra el cambio en el cambio de longitud de onda de máxima absorción (batocrómico) y en la intensidad del color (efecto hiperocrómico) para cianidina 3-glucósido copigmentado con ácido rosmarínico (Maarit Rein, 2005).

Al igual que en todas las reacciones de las antocianinas, las reacciones de copigmentación se ven fuertemente afectados por la temperatura, pH, las concentraciones, los disolventes y las estructuras de moléculas (Rein, 2005).



A) cianinida-3-glucosido, B) Cianinida-3-glucosido + ácido rosmarínico

Figura 20 Efecto hiperocrómico y cambio batocrómico (Rein, 2005)

La copigmentación puede ser una valiosa herramienta natural para mejorar el color de los alimentos ricos en antocianina, el color de que puede ser estabilizado y mejorado por la adición de extractos de plantas ricas en copigmentos. Se ha observado ya que copigmentación es más intensa en los zumos de bayas que con las moléculas de antocianina purificada de estos jugos (Rein, 2005) Esto indica que otros componentes del material de jugo desempeñan un papel importante en el fenómeno de copigmentación.

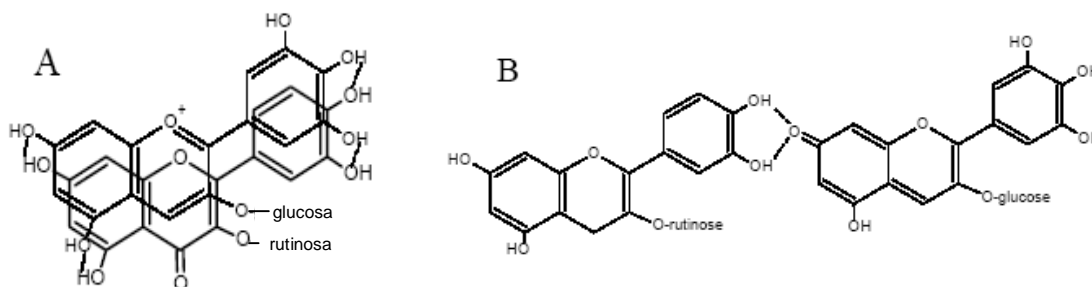
2.6.1 Copigmentos

Las moléculas llamadas copigmentos son incoloras o sólo ligeramente coloridas, sobre todo amarillas, color que se da naturalmente en las células reino vegetal junto con las antocianinas. Una amplia gama de diferentes moléculas se ha encontrado para actuar como copigmentos. Los más comunes copigmentos son compuestos estructuralmente relacionados como son los flavonoides, polifenoles y otros alcaloides, los aminoácidos y ácidos orgánicos. El grupo más estudiado de copigmentos es el de los flavonoides, de los cuales flavonoles y flavanoles han sido objeto de examen profundo, también los ácidos fenólicos, es decir, los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos, ya que estos pueden brindar una ayuda en la estabilización de las antocianinas.

2.6.2 Copigmentación intermolecular

La interacción intermolecular es la manera más prominente de copigmentación en frutas y bayas, y los productos derivados de ellos. La copigmentación intermolecular se define como la interacción entre un color (copigmento incoloro o no) y una antocianina, que no se une de forma covalente a la molécula de antocianina. El enlace de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas son los principales mecanismos de copigmentación intermoleculares, lo que resulta en la formación de complejos 1:1.

Las interacciones intermoleculares pueden ocurrir con cationes como el flavilio y las formas de base quinonoidal de la antocianina. Estas dos formas de equilibrio de color de las antocianinas son casi planas, con electrones- π deslocalizados, lo que ocasiona interacciones con copigmentos, que presenten las mismas características estructurales, haciendo esto que las interacciones entre el catión flavilio o base quinoidal y un copigmento sea mucho más fácil y probable. Esto resulta en un traslape de acumulación de las dos moléculas, lo que previene un posible ataque nucleofílico de agua en la molécula de antocianina. La formación de enlaces de hidrógeno entre el grupo cetona de la forma de base-quinoidal de una antocianina y copigmentos de flavonoles se ha sugerido como un posible medio de la formación de complejos (Rein, 2005) (figura 21).



A) Complejo enclavado B) complejo paralelo

Figura 21 Interacciones intermoleculares (Rein 2005).

2.6.3 Copigmentación intramolecular

La copigmentación intramolecular es definida como un copigmento que es parte de la molécula de antocianina. La definición específica para las antocianinas es que se produjo una acilación covalente de la molécula de copigmento a la antocianina y la estabiliza. Esta acilación esta siempre unida a una molécula del glicósido de una antocianina. La copigmentación intramolecular es más fuerte y más eficaz en la estabilización del color de antocianinas que las copigmentaciones intermoleculares probablemente debido a los puntos fuertes de los enlaces.

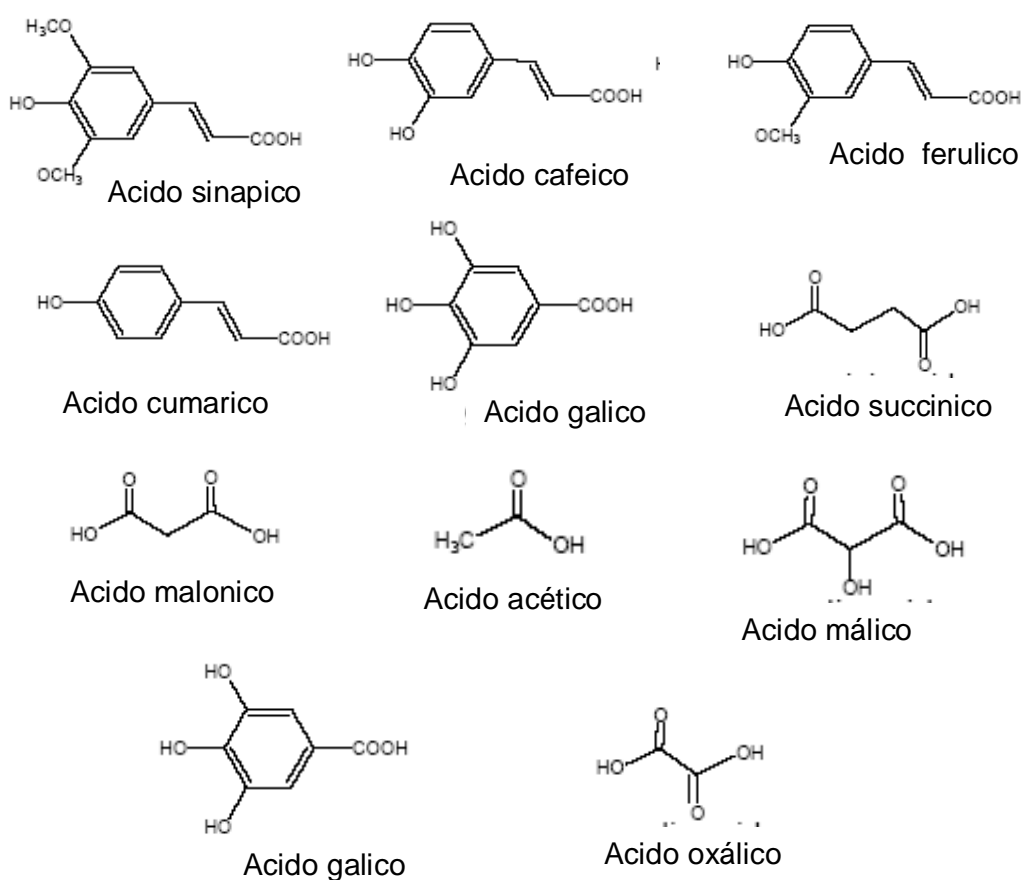
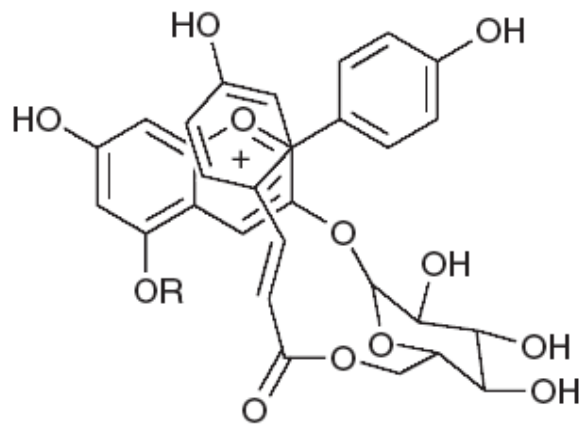


Figura 22 Estructura de diferentes acilantes que participan en la copigmentación intramolecular (Rein, 2005).

Los residuos aromáticos de los grupos acilo de una antocianina interactúan con el catión flavilio cargado positivamente para que la reactividad del carbono C-2 y C-4 con los reactivos nucleofílicos, por ejemplo, las moléculas de agua, se vean obstaculizadas hacia el oxígeno del anillo A como se observa en la figura 23.



Glucósidos acilado de pelargonidina por el ácido p-cumárico

Figura 23 Ejemplo de acilación intramolecular (Betchold, 2009)

Tanto el número de grupos acilo, su estructura, y la posición de enlace a los residuos de los glicosidos, así como la estructura y el número de sacáridos contribuyen a la copigmentación intramolecular, ya que el efecto de la copigmentación en las antocianinas monoaciladas no es tan eficiente como la de las antocianinas poli-aciladas. Se cree que en el caso de una antocianina monoacilada, uno de los lados del cromóforo está desprotegido y el agua es capaz de atacar a la parte no protegida de la aglicona, y sólo una estabilización parcial se establece. Los residuos de glicósido son considerados como separadores, que permiten el plegado del grupo acilo en el aglicona que tiene lugar, esto permite la interacción de un grupo acilo unido a un residuo glucosídico, que se encuentra en cualquiera de las 3 , 5 , 7 , 3' o 5'-posiciones del cromóforo de antocianina. Las antocianinas aciladas con sustituyentes en C-7 y C-3 se ha observado que protegen completamente la antocianina de la hidratación, resultando en una estabilidad mayor de la antocianina en medio ligeramente ácidos o neutros. Sin embargo, los residuos de ácido cafeico esterificados a una unidad de glicosido en posición 3' de delphinidina producen un efecto de copigmentación, pero cuando se esterifica a una unidad de glicósido en posición 5 de la antocianidina no se da un efecto de copigmentación significativo. En el caso de pelargonidina 3-(cafeil) soforosido-5-glucósido, el espaciador del glicósido fue considerado demasiado corto para permitir un contacto lo suficientemente cerca de la mitad de acilo para proteger adecuadamente el cromóforo (Maarit Rein 2005).

2.7 Aspectos metodológicos para la obtención de Antocianinas

2.7.1 Extracción

Las antocianinas son moléculas polares y por lo tanto son más solubles en solventes polares que en solventes no polares. Sin embargo, es evidente que la solubilidad depende de varios factores, incluyendo las condiciones del medio, por ejemplo con un valor de pH en el que la molécula no este ionizada, las antocianinas pueden ser solubles en eter y no son estables en soluciones neutras o alcalinas, por lo que los métodos convencionales de extracción de antocianos implican el uso de ácidos en los disolventes. Los sistemas de extracción se han modificado para producir un mejor rendimiento, pero en algunos casos han sido comprometidos por problemas de seguridad por las características de los disolventes y los ácidos que se utilizan. El ácido clorhídrico, sirve para mantener un pH bajo que a la vez favorece la formación de las formas de color de las antocianinas, sin embargo, se trata de un ácido fuerte, que puede alterar la forma nativa de antocianinas, por ejemplo, rompiendo algunas asociaciones débiles con los metales y copigmentos. Algunas antocianinas contienen grupos alifáticos, acilo dicarboxílicos como el acido malónico, málico y oxálico. Estos grupos acilo son susceptibles a ser hidolizados de la molécula de antocianina por soluciones diluidas de ácido clorhídrico, por lo que, ácidos más débiles (por ejemplo, el ácido cítrico o ácido acético) se pueden utilizar en el procedimiento de extracción. En consecuencia, el uso de un ácido orgánico débil es recomendado para la extracción de antocianinas complejas.

Nuevas técnicas de extracción de las muestra se han introducido para satisfacer criterios más estrictos en las áreas de alimentación y la agricultura, por ejemplo, las técnicas respetuosas del medio ambiente, no tóxicas, rápidas, automatizadas y rentables. La extracción acelerada con disolventes (ASE) y la extracción de líquido a presión (PLE) son dos métodos desarrollados para la extracción de productos químicos de interés y presentan un elevado rendimiento y eficiencia en una amplia gama de muestras botánicas, animales y biológicas. Las técnicas de ASE y PLE combinan disolventes a temperaturas que van de 40 a 200 ° C y presiones 500 a 3000 psi con un gas inerte por periodos cortos 5 a 10 min. Debido a que las antocianinas son sensibles al calor, la velocidad de degradación de antocianinas es acelerada a temperaturas superiores a 70 °C. La extracción con fluido supercrítico (SFE) es otra tecnología de separación moderna que se suele utilizar para extraer los compuestos lipofílicos como el aceite de semilla de arándano, el licopeno, cumarinas y otros aceites de semillas. Las antocianinas en general y en particular las glicosiladas se consideraron no aptas para el SFE debido a sus

propiedades hidrofílicas, ya que la SFE es aplicable para los analitos no polares. Sin embargo, una pequeña cantidad de metanol se aplicó como co-disolvente para aumentar la polaridad de CO₂ en la extracción de antocianinas del orujo de la uva. Las nuevas aplicaciones de la SFE para la purificación de antocianinas se han reportado para aplicaciones cosméticas de frutas rojas (Delgado-Paredes 2003).

2.7.2 Purificación de extractos crudos

Diferentes resinas han sido utilizadas para limpiar o pre-fraccionar antocianinas antes del aislamiento o la caracterización tales como: las resinas de intercambio iónico, de poliamida y materiales de gel.

La cromatografía en Dowex o amberlita, resinas de intercambio iónico y resina en polvo de poliamida [por ejemplo, polivinil pirrolidona (PVP)], ha sido utilizada para aislar los compuestos polares no fenólicos en los extractos de antocianina crudo y concentrado de antocianinas. La resina GC-50 esta resina de intercambio se ha utilizado para eliminar el azúcar y el concentrado de antocianinas. La resina XAD-7 es un adsorbente polimérico, tiene una polaridad intermedia y absorbe bien los materiales hidrofóbicos del agua o materiales hidrofílicos de los sistemas no acuosos. Su aplicación en la recuperación de fenoles es útil para la purificación de antocianinas de otros compuestos que son más hidrofílicos o hidrofóbicos. La cromatografía en columna de gel se puede utilizar para un mayor aislamiento de las antocianinas con Sephadex LH-20. Es útil para la purificación de las antocianinas individuales y la separación de fenoles no poliméricos y polímeros. Los cartuchos C-18 sep-pak se han hecho populares debido a su facilidad de uso y de alta eficiencia para fraccionar antocianinas. En una fase acuosa, antocianinas y otros compuestos hidrofóbicos están retenidos mientras que los compuestos más hidrofílicos tales como ácidos y azúcares pueden ser lavados con agua. El agua puede estar ligeramente acidulada con HCl 0,01% para estabilizar las antocianinas en la resina C18. La separación cromatográfica de antocianinas desempeña un papel importante en los análisis de los patrones de compuestos fenólicos en los extractos crudos (Delgado-Paredes 2003).

2.7.3 Cromatografía en capa fina

La cromatografía de papel (PC) y la cromatografía de capa fina (TLC) se han utilizado desde 1940. Preparativos PC en Whatman # 3 papel, PC analítico sobre Whatman # 1 de

papel, y el TLC de análisis sobre la celulosa microcristalina, gel de sílice, o poliamida, se han aplicado con una variedad de disolventes y los comportamientos de las antocianinas han sido similares en todos los medios. La TLC de dos dimensiones permite la separación de varios compuestos y se ha utilizado para aclarar la composición antociánica de los distintos productos. Algunos de los sistemas de solventes usados con frecuencia incluyen n-butanol, ácido acético y agua (BAW, 4:01:05), n-pentanol, ácido acético y agua (VAR, 2:1:1, ácido acético, HCl concentrado, y el agua (AHW, 25:3:72), y el 1% HCl acuoso (agua y HCl concentrado, 97:3). En general, con sustituciones de antocianos más glucosídicos se tienen menores valores de Rf en disolventes como BAW y VAR, pero mayor Rf en AHW y el 1% de HCl, mientras que la adición de grupos acilo tiene generalmente el efecto contrario (Delgado-Paredes 2003).

2.7.4 Cromatografía en contracorriente de alta velocidad (HSCCC)

Por lo general, los lípidos, clorofila y ácidos fenólicos pueden ser separados por partición líquido-líquido. Los lípidos y la clorofila se pueden quitar de los extractos de acetona-agua con vapores de cloroformo mientras que los ácidos fenólicos tienen una mayor afinidad por el acetato de etilo a un pH cercano a la neutralidad. La HSCCC está atrayendo la atención en base a su escala de separación alta, 100% de recuperación de la muestra, y condiciones suaves de funcionamiento. Se trata de un proceso de separación cromatográfico basado en los coeficientes de reparto de los analitos diferentes en dos sistemas de disolventes inmiscibles (fase móvil y fase estacionaria) y se ha sometido a un campo de aceleración centrífuga. Un sistema bifásico de disolventes compuesto de éter metil tert-butílico, n-butanol, acetonitrilo, y agua (2:2:1:5) acidificada con ácido trifluoroacético ha sido aplicado a las antocianinas a fraccionar. La parte superior (fase orgánica), actúa como la fase estacionaria y la inferior (acuosa) como fase móvil. La HSCCC se ha aplicado para obtener varias fracciones de antocianinas del vino, la col roja, pasas de Corinto negro, los arándanos (*Vaccinium myrtillus*), antocianinas aciladas, y también aislar antocianinas individuales a partir de vino.

2.7.5 Cromatografía de líquidos de alta resolución

El equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ha demostrado ser rápido y sensible para el análisis de los componentes fenólicos vegetales y es especialmente útil para el análisis de los antocianos. El sistema más popular es una columna de fase inversa (C18), en una columna de base de sílice. Sin embargo, el uso de C18 en una columna a

base de polímero ha sido reportado por brindar una mejor resolución, especialmente para la separación de mezclas complejas que contienen pigmentos antocianos acilados (Delgado-Paredes 2003). Las columnas a base de polímero muestran también una buena estabilidad a condiciones de funcionamiento de pH bajo. La polaridad en general y estereoquímica de las antocianinas son los factores clave para su separación. El orden de elución será dependiente de las sustituciones o metoxilo hidroxilo del anillo pirilio, el número y naturaleza de los sustituyentes del azúcar además de la presencia de grupos acilantes número y naturaleza de los mismos. En general, más glicosilaciones o aumento de hidroxilaciones de la antocianina incrementan la movilidad, mientras que O-metilaciones y acilaciones aumentan el tiempo de elución. Sin embargo, esto no es una regla estricta, las desviaciones de este comportamiento pueden depender de la naturaleza y la posición de las sustituciones. Por ejemplo, los 3-rutinósidos tienen tiempos de retención que la correspondiente a 3-glucósidos debido a la no polaridad impartidos por el grupo metilo de la ramosa en la posición C6. Las típicas fases móviles están compuestas de los gradientes de ácido acético, fosfórico o fórmico en agua-metanol o disolventes como acetonitrilo-agua en los que las antocianinas se encuentran y pueden ser fácilmente detectado en sus longitudes máximas de absorción (λ máx) (Socaciu, 2008).

Diferentes detectores están disponibles para el monitorear la elución de las antocianinas, incluidos los espectrofotómetros de longitud de onda monocromática o múltiple, detectores de fotodiiodo y más recientemente, los espectrómetros de masas. Un detector de fila de fotodiiodos analiza los datos espectrales UV-Vis de la muestra de elución cada pocos segundos y permite la interpretación de los datos espectroscópicos y la detección de impurezas que eluyen conjuntamente con los compuestos de interés. Las antocianinas son por lo general detectadas con un control de estándares conocidos efectuado a 480 a 550 nm, comparando los tiempos de retención y el espectro UV-Vis.

2.8 Caracterización

2.8.1 Características espectrales

Las diferentes agliconas tienen diferentes valores en sus longitudes máximas de absorción (λ max) visibles que van desde 520 nm para pelargonidina a 546 de delfinidina, y sus monoglicosidos al exhibir sus niveles λ max visibles alrededor de 10 a 15 nm por debajo. Las formas de los espectros pueden dar información sobre los números y las posiciones de sustituciones glucosídicos y el número de acilaciones. La relación entre la absorbancia a 440 y la absorbancia en sus longitudes máximas de absorción visible (λ

max) es casi el doble para antocianinas con sustituciones glicosídicas en la posición 3 en comparación con aquellos con sustituciones en las posiciones 3 y 5 o en la posición 5 solamente. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las antocianinas de pelargonidina también tienen longitudes máximas de absorción (λ max.) máximas evidentes en los 440 nm aproximadamente. La presencia de sustituciones glucosídicas en otras posiciones, por ejemplo, 3,7-diglicosidos, pueden ser reconocidos debido a que presentan diferentes espectros de las de los antocianos con los patrones de sustitución común. La presencia de acilación del ácido cinámico es revelada por la presencia de una tercera banda de absorción en el rango de 310 a 360 nm. La relación de absorbencia a 310 a 360 nm y la absorbencia en el visible λ max dará una estimación del número de grupos de acilación. Si la proporción es baja, no hay acilación; si se exceden del 0,5, una o más acilaciones han ocurrido. Los disolventes utilizados para la determinación del espectro afectarán a la posición de las bandas de absorción y por lo tanto hay que tener en cuenta al comparar los datos disponibles. La disponibilidad de los sistemas HPLC combinada con detectores de fotodiodo permite la caracterización espectral de antocianinas.

2.8.2 Espectroscopia de Masas

El uso de análisis espectroscópicos de masas para la caracterización de antocianinas ha aumentado notablemente en los últimos diez años (Socaciu 2008). En la mayoría de los informes se destaca el uso de HPLC combinado con detectores de masas (MS) o aislar pigmentos individuales previo al análisis espectroscópico de masas.

La determinación exacta del peso molecular es muy importante para el esclarecimiento de las antocianinas de estructura compleja ya que los componentes pequeños con poca absorción UV-Vis, y que muestran débil o ninguna señal de RMN, pueden pasarse por alto si el peso molecular no es conocido. La espectroscopia de masas (MS) se puede utilizar para pruebas cualitativas y análisis cuantitativos de las antocianinas, diferenciando los fragmentos cargados en campos electrónicos y magnéticos de acuerdo a los coeficientes de su masa-carga. En general, la espectrometría de masas está compuesta por tres componentes: las fuentes de iones, el analizador de masa, y el detector. Las técnicas de ionización más utilizadas para los análisis de antocianinas son el bombardeo rápido de átomos (FAB) y el de ionización por electrospray (ESI). La espectrometría de masa tándem (MS-MS) utiliza más de un analizador de masas de estudios estructurales y las secuencias que se han encontrado son muy útiles para la caracterización de antocianinas. Estos analizadores de masa pueden ser de tipos (triples

o cuadrupolares) o híbridos como el cuádruplo de trampa iónica, y cuádruplo-tiempo de vuelo- (TOF) para el análisis estructural de antocianinas.

Los patrones de fragmentación pueden proporcionar información sobre las posiciones de las sustituciones glucosídicos en una antocianina. Por ejemplo, un 3-disacárido suele generar un fragmento de iones de la aglicona además de los iones moleculares intactos (m/z). Sin embargo, en el caso de una sustitución de 3,5-disacárido, diferentes fragmentos se producirán, correspondiente a la rotura de los enlaces glucosídicos a los 3 y 5 posiciones, además de los iones moleculares intactos (m/z) y el ion de la aglicona (Socaciu 2008).

El acoplamiento de la cromatografía líquida en fase reversa a MS permite a las moléculas que se caracterizan por el tiempo de retención, la respuesta de la radiación UV-Vis, y la información espectral de masas de los componentes individuales y los fragmentos y está es la técnica que se empieza a utilizar con mayor frecuencia.

2.8.3 Resonancia magnética nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es el método más poderoso para la elucidación estructural en solución y los avances en las técnicas de RMN han tenido un impacto significativo en los estudios de antocianinas. La caracterización estructural completa de las antocianinas es posible con las técnicas de RMN de una y de dos dimensiones. Sin embargo, las cantidades relativamente grandes de materiales purificados son necesarios para la resolución de las señales de protones asociados con los azúcares y las posiciones C6 y C8 del núcleo flavilio. La naturaleza de la aglicona y el número de glicosilaciones, acilantes y grupos presentes en una molécula que normalmente se puede apreciar desde una sola dimensión ^1H -RMN. Cuando el espectro unidimensional es demasiado complejo, es útil para llevar a cabo un experimento bidimensional para simplificar y clarificar los espectros de la magnitud de las constantes de acoplamiento. Muchos estudios recientes de la espectroscopía de RMN se han reportado para el esclarecimiento de la estructura de las antocianinas extraídas de materiales de plantas que son como zanahorias, fresas, moras, flores, soya negro, y la antocianina y los derivados de flavonoles en el vino tinto (Socaciu 2008).

2.9 Función biológica

Se ha propuesto que las antocianinas cumplen con varias funciones en una gran variedad de vegetales y sus interacciones con los animales. Estas incluyen la atracción de los polinizadores y frugívoros, así como la repelencia de los herbívoros y parásitos. Las propiedades ópticas de las antocianinas pueden servir como señales visuales al potencial de los herbívoros, lo que indica una fuerte ingestión de productos químicos tóxicos o desagradables. Otro ejemplo, con la coloración es que esta puede servir como un mecanismo de defensa fisiológica, para proteger a las semillas u hojas jóvenes, sus flores y sus frutas contra la luz ultravioleta (UV) y, por sus propiedades antioxidantes, evitan la producción de radicales libres (Gould-Davies 2009). Las hojas de muchas especies muestran un color rojo bien diferenciado durante el otoño, tales como: *Amherstia*, *Andira*, *Bombax*, *Brownea*, *Calophyllum*, *Cecropia*, *Ceiba*, *Cinnamomum*, *Coccoloba*, *Diospyrus*, *Eugenia*, *Gustavia*, *Lophira*, *Mangifera*, *Mesua*, *Pachira*, *Persea*, *Saraca*, *Triplaris* también se encuentran altas concentraciones de antocianinas en *Acalypha* y en muchas especies de las familias *Araceae*, *Bromeliaceae*, *Marantaceae*, *Liliaceae* y *Euphorbiaceae*, que atraen a los polinizadores a sus flores mediante los brillantes colores provistos por estos compuestos. En algunos árboles, como el arce rojo Americano (*Acer rubrum*) o el roble escarlata (*Quercus coccinea*), los flavonoles (un tipo de flavonoide) incoloros se convierten en antocianinas rojas cuando la clorofila de sus hojas se degrada. En otoño, cuando la clorofila se descompone, los flavonoides incoloros se ven privados del átomo de oxígeno unido a su anillo central, lo que los convierte en antocianinas, dando colores brillantes. Esta transformación química que consiste sólo en la pérdida de un átomo de oxígeno es la responsable de nuestra percepción de los colores del otoño. Las antocianinas que aparecen en el otoño probablemente son las que protegen a las hojas del efecto de los rayos UV del sol (Clifford, 2000).

Las antocianinas también se han implicado en el camuflaje de las partes de las plantas en interacción con los fondos de donde se encuentran, en el debilitamiento de la cripsis de insectos y en el mimetismo de las estructuras defensivas. Estas hipótesis en los últimos años han atraído fuerte apoyo teórico y cada vez más pruebas experimentales. Por lo general se hace hincapié en que las antocianinas en las plantas pueden operar simultáneamente en la defensa y en las funciones fisiológicas (Gould-Davies, 2009).

2.10 Antocianinas como nutraceuticos.

Estudios epidemiológicos efectuados en varios países evidencian que el consumo de frutos y vegetales reducen enfermedades coronarias además de minimizar los riesgos de cáncer, se ha descrito que algunos compuestos fenólicos de origen vegetal presentan actividad antioxidante dentro de la célula, reduciendo la concentración de radicales libres y en algunos casos logran establecer grupos de quelación con iones metálicos, siendo un ejemplo las interacciones entre los flavonoides y antocianinas. Son cada vez más citados como responsables de una intensa actividad biológica en las mezclas naturales (en comparación con los compuestos purificados) tanto *in vitro* como en ensayos de actividad biológica *in vivo*. Lo que ha provocado un consumo regular de antocianinas y otros polifenoles en frutas, verduras y vinos. Los mecanismos involucrados de los agentes antioxidantes establecen donación de electrones o átomos de hidrógeno a los radicales libres. Los agentes antioxidantes presentes en alimentos pueden reducir trombosis, activar macrófagos e inhibir la tendencia a la peroxidación. Entre los compuestos que han merecido dichos estudios se encuentran las antocianinas, debido a la presencia de sustituyentes -OH, los cuales son moléculas con alto poder antioxidante.

Como respuesta a la permanente producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) que dañan estructuras biológicas, el organismo atenúa estos efectos deletéreos por medio de la acción de sistemas antioxidantes. Los antioxidantes aportados por la dieta disminuyen los efectos de las EROs. Son variados los alimentos que están constituidos por estas sustancias y cada vez más utilizados por las personas tanto por medio del consumo directo de vegetales y frutas que los incluyen, como también por medio del uso de fármacos.

Los antioxidantes son sustancias que se encuentran en pequeñas concentraciones en comparación a un sustrato oxidable, que retrasa o inhibe significativamente la oxidación del sustrato y también estabiliza las EROS mediante la cesión de un H⁺ y las convierte en compuestos no radicalarios. Otras definiciones hablan de antioxidante como cualquier sustancia que, al estar presente en bajas concentraciones comparada a las de un sustrato oxidable, previene o retarda la oxidación de dicho sustrato y que protege a los sistemas biológicos frente a efectos potencialmente perjudiciales tanto de procesos como reacciones que causan excesivas oxidaciones.

Las antocianinas aún no han sido utilizados terapéuticamente, a pesar de que su historial de seguridad es excepcional así como los múltiples reportes sobre la presencia de antocianinas y otros flavonoides en los alimentos, sus posibles efectos y su probable

papel en la reducción de las enfermedades coronarias, cáncer, diabetes; a sus efectos antiinflamatorios y mejoramiento de la agudeza visual y comportamiento cognitivo y teniendo además un papel funcional como colorantes, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano, por lo cual las diferentes antocianinas y flavonoides son consideradas como nutraceuticos (Delgado-Vargas 2003).

2.11 Antocianinas como colorantes

Las antocianinas son pigmentos interesantes con respecto a sus características cromáticas. El más antiguo extracto de antocianinas utilizado en la industria alimentaria es la enocianina que se obtiene del orujo de la uva roja y comercializado en Italia desde 1879 (Gould *et. al* 2009).

Hoy en día las aplicaciones comerciales de las antocianinas como colorantes de alimentos incluyen refrescos, conservas de frutas (mermeladas), productos de confitería de azúcar (jaleas), productos lácteos (básicamente, yogures), mezclas secas (postre ácido y mezclas de polvos de bebidas) y los productos congelados (helados) y algunas bebidas alcohólicas. Entre estas aplicaciones, los refrescos han sido el blanco principal y es ideal para el uso de las antocianinas como colorante. Teniendo todos los factores anteriormente mencionados que regulan y limitan la aplicación de las antocianinas en las matrices de alimentos, un pH inferior a 3,5 parece ser necesario para obtener el color rojo que se desee. Las antocianinas naturales tienen poderosas propiedades colorantes, ya que sólo pequeñas dosis de antocianinas son necesarias para mostrar el color deseado en matrices de varios alimentos (por ejemplo, 30-40 ppm para los refrescos y 20-60 ppm para conservas de frutas). En general, los colorantes naturales tienen mayor capacidad que los colorantes sintéticos, como se ve desde su absorción relativa de la luz. Las antocianinas se utilizan casi exclusivamente para ofrecer un color rojo a los productos alimenticios, pero en algunos casos las betalainas (otro grupo de compuestos naturales) son preferibles. Este es uno de los motivos por lo que los extractos de uva son ampliamente utilizados como fuentes de antocianinas de colorantes naturales. Además, las antocianinas pueden obtenerse fácilmente en grandes cantidades a partir de uvas ya que estos últimos representan aproximadamente una cuarta parte de la cosecha anual de fruta en todo el mundo. Desde una perspectiva económica, algunas de las mejores fuentes comerciales de antocianinas son aquellas de las que el pigmento es un subproducto de algunos procesos industriales que utilicen el valor añadido de otros

productos, como extractos de la piel de la uva. Por esa razón, se ha prestado más atención al potencial de otros residuos ricos en productos derivados, tales como las brácteas del banano (Gould *et al.* 2009).

Por otra parte, las transformaciones químicas de la obtención de nuevos pigmentos antocianicos con tonos de color diferente y único, parece rentable. Varios grupos de investigación están conduciendo sus investigaciones hacia la identificación y caracterización de pigmentos de diferentes fuentes naturales, especialmente los extractos de fruta roja, con el fin de utilizarlos como colorantes. En general, las antocianinas son compuestos naturales de interés para ser utilizados como colorantes de alimentos, ya que pueden mostrar una amplia gama de atractivos colores, son solubles en agua y tienen efectos de promoción de la salud (Gould *et al.* 2009).

2.12 Maíz

Maíz, palabra de origen caribeño (antillas mayores) del taino *mahis*, que significa literalmente «lo que sustenta la vida». El maíz, que es junto con el trigo y el arroz uno de los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos y a los animales y es una materia prima básica de la industria de transformación, con la que se producen almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco, combustible. La planta tierna, empleada como forraje, se ha utilizado con gran éxito en las industrias lácteas y cárnicas y tras la recolección del grano, las hojas secas y la parte superior, incluidas las flores, aún se utilizan hoy en día como forraje de calidad relativamente bueno para alimentar a los rumiantes de muchos pequeños agricultores de los países en desarrollo. Los tallos erectos, que en algunas variedades son resistentes, se utilizan para construir cercas y muros duraderos. Botánicamente, el maíz (*Zea mays*) pertenece a la familia de las gramíneas y es una planta anual alta dotada de un amplio sistema radicular fibroso. Se trata de una especie que se reproduce por polinización cruzada y la flor femenina (elote, mazorca, choclo o espiga) y la masculina (espiguilla) se hallan en distintos lugares de la planta. Las panojas -a menudo, una por tallo- son las estructuras donde se desarrolla el grano, en un número variable de hileras (12 a 16), produciendo alrededor de 300 granos, que pesan entre 190 y 300 g por cada 1 000 granos. El peso depende de las distintas prácticas genéticas, ambientales y de cultivo. El grano constituye aproximadamente el 42 por ciento del peso en seco de la planta. El maíz es a menudo de color blanco o amarillo, aunque también hay variedades de color negro, rojo y jaspeado. Hay varios tipos de

grano, que se distinguen por diferencias en las cantidades de los compuestos químicos depositados o almacenados en él.

Las variedades cultivadas fundamentalmente para alimentación comprenden el maíz dulce y el reventador, aunque también se usan en buena medida el maíz dentado, el amiláceo o harinoso y el cristalino; este último también se utiliza para piensos. El maíz normal inmaduro en la panoja es objeto de gran consumo, hervido o tostado. El maíz harinoso es un grano con endospermo blando que se emplea mucho como alimento en México, Guatemala y los países andinos. El maíz de tipo dentado tiene un endospermo calloso y vítreo a los lados y en la parte posterior del grano, en tanto que el núcleo central es blando. El maíz de tipo cristalino posee un endospermo grueso, duro y vítreo, que encierra un centro pequeño, granuloso y amiláceo (Hoseney, 1996)

Tabla 6 clasificación del maíz (FAO)

Reino	Vegetal
Clase	Angiospermo
Subclase	Monocotiledonae
Grupo	Glumiflora
Orden	Graminales
Familia	<i>Gramineae</i>
Tribu	<i>Maydeae</i>
Genero	<i>Zea</i>
Especie	<i>Zea Mays</i>

2.12.1 Origen del maíz

El cultivo del maíz tuvo su origen, con toda probabilidad, en América Central, especialmente en México, de donde se difundió hacia el norte hasta Canadá y hacia el sur hasta Argentina. La evidencia más antigua de la existencia del maíz, que es de unos 7 000 años de antigüedad, ha sido encontrada por arqueólogos en el valle de Tehuacán (México) pero es posible que hubiese otros centros secundarios de origen en América. Este cereal era un artículo esencial en las civilizaciones maya y azteca y tuvo un importante papel en sus creencias religiosas, festividades y en la nutrición; ambos pueblos incluso afirmaban que la carne y la sangre estaban formadas por maíz. La supervivencia del maíz más antiguo y su difusión se debió a los seres humanos, quienes

recogieron las semillas para posteriormente plantarlas. A finales del siglo XV, tras el descubrimiento del continente americano por Cristóbal Colón, el grano fue introducido en Europa a través de España. Se difundió entonces por los lugares de clima más cálido del Mediterráneo y posteriormente a Europa septentrional. El maíz crece desde los 58° de latitud norte en Canadá y Rusia y hasta los 40° de latitud sur en el hemisferio meridional. Se cultiva en regiones por debajo del nivel del mar en la llanura del Caspio y a más de 4 000 metros de altura en los Andes peruanos (Colección FAO: Alimentación y nutrición, N°25).

Pese a la gran diversidad de sus formas, al parecer todos los tipos principales de maíz conocidos hoy en día, clasificados como *Zea mays*, eran cultivados ya por las poblaciones autóctonas cuando se descubrió el continente americano. Por otro lado, los indicios recogidos mediante estudios de botánica, genética y citología apuntan a un antecesor común de todos los tipos existentes de maíz. La mayoría de los investigadores creen que este cereal se desarrolló a partir del *teosintle*, cultivo anual que posiblemente sea el más cercano al maíz. Otros creen, en cambio, que se originó a partir de un maíz silvestre, hoy en día desaparecido. La tesis de la proximidad entre el *teosintle* y el maíz se basa en que ambos tienen 10 cromosomas y son homólogos o parcialmente homólogos.

Ha habido introgresión (retrocruzamiento reiterado) entre el *teosintle* y el maíz y sigue habiéndola hoy en día en algunas zonas de México y Guatemala donde el *teosintle* puede crecer en los cultivos de maíz. Esencialmente hay dos hipótesis sobre el origen del maíz: la primera es que el *teosintle* actual es el antecesor silvestre del maíz, y/o un tipo primitivo de *teosintle* es el antecesor silvestre común del maíz y del *teosintle*; la segunda es que una forma desaparecida de maíz tunicado fue el antecesor del maíz, y el *teosintle* fue, en cambio, una forma mutante de dicho grano tunicado.

En cualquier caso, la mayoría de las variedades modernas del maíz proceden de material obtenido en el sur de los Estados Unidos, México y América Central y del Sur (Colección FAO: Alimentación y nutrición, N°25).

2.12.2 La planta del maíz

Se puede definir la planta del maíz como un sistema metabólico cuyo producto final es, en lo fundamental, almidón depositado en unos órganos especializados: los granos.

El desarrollo de la planta se puede dividir en dos fases fisiológicas. En la primera, o fase vegetativa, se desarrollan y diferencian distintos tejidos hasta que aparecen las estructuras florales. La fase vegetativa consta de dos ciclos; en el primero se forman las primeras hojas y el desarrollo es ascendente; en este ciclo, la producción de materia seca es lenta y finaliza con la diferenciación tisular de los órganos de reproducción. En el segundo ciclo se desarrollan las hojas y los órganos de reproducción; este ciclo acaba con la emisión de los estigmas. La segunda fase, también llamada fase de reproducción, se inicia con la fertilización de las estructuras femeninas que se diferenciarán en espigas y granos. La etapa inicial de esta fase se caracteriza por el incremento de peso de las hojas y otras partes de la flor; durante la segunda etapa, el peso de los granos aumenta con rapidez. La planta ha desarrollado características y diferencias morfológicas en la fase vegetativa y de reproducción como consecuencia de la evolución, de la selección natural y de la domesticación. Algunos genotipos se han adaptado a zonas ecológicas concretas, desarrollando características particulares, como por ejemplo la sensibilidad con respecto a la duración del día y a la temperatura que limitan su adaptabilidad a zonas con diferente latitud y altitud. Por tanto, se deben realizar programas de mejora en las zonas en que se van a cultivar las variedades mejoradas, aunque esto no significa, empero, que se puedan obtener características genéticas específicas mediante retrocruzamiento. La morfología o arquitectura de la planta también ha sido objeto de cambios evolutivos que han dado lugar a una gran variabilidad del número, la longitud y la anchura de las hojas, así como de la altura de las plantas, los lugares en que aparecen las mazorcas, el número de éstas por planta, los ciclos de maduración, los tipos de granos y el número de hileras de granos, entre otras muchas características (Colección FAO: Alimentación y nutrición, N°25).

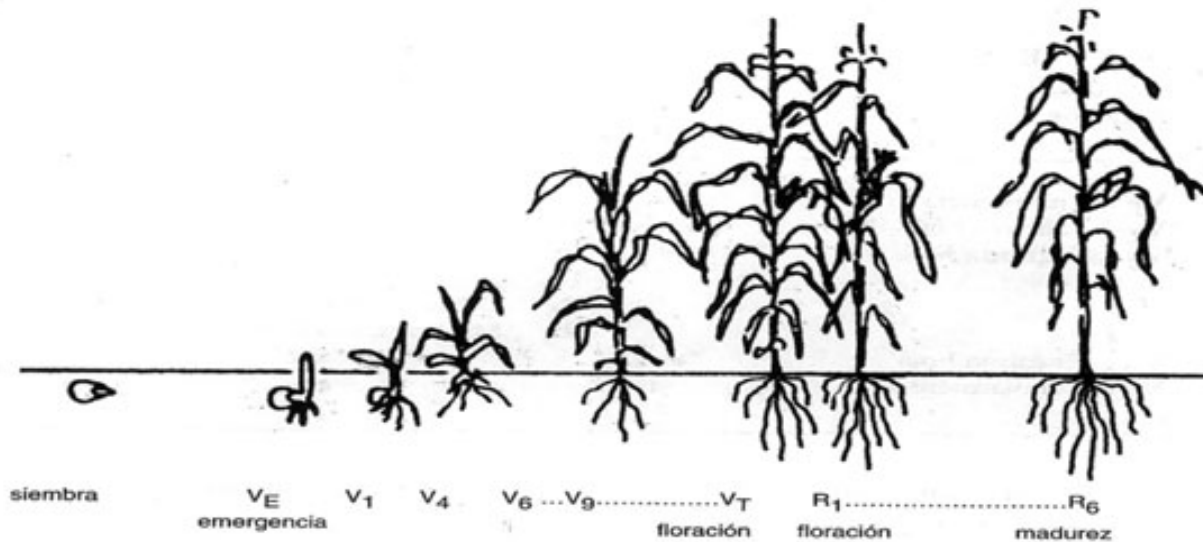


Figura 24 Crecimiento de la planta de maíz (<http://www.econoagro.com/>)

Esta variabilidad es de gran valor para mejorar la productividad de la planta y determinados elementos orgánicos del grano. Los principales factores del rendimiento son el número y el peso de los granos, y vienen determinados por factores genéticos cuantitativos que se pueden seleccionar con relativa facilidad. El número de granos está determinado por el número de hileras y el número de granos por hilera de la mazorca. El tamaño y la forma del grano determinan su peso, asumiendo factores constantes como la textura y la densidad de los granos. Una hectárea de maíz produce cerca de 1,55 toneladas de residuos de tallos. En plantas de maíz secadas sobre el terreno de tres localidades de Guatemala, el peso en seco de las plantas variaba entre 220 y 314 g con las siguientes proporciones: 1,8% de flores secas, de 14,7% a 27,8% de tallos y de 7,4 % a 15,9% de hojas. Las envolturas de las mazorcas representaban del 11,7% al 13%, los carozos del 9,7% al 11,5% y el grano secado sobre el terreno del 30% al 55,9% del peso total en seco de la planta. Estas cifras muestran la importancia del volumen de residuos de la planta que a menudo se dejan en el terreno; pese a todo, su distribución puede variar, pues se sabe que cerca de la mitad de la materia seca está constituida por grano y la otra mitad por residuos de la planta, con exclusión de las raíces (Colección FAO: Alimentación y nutrición, N°25).

2.12.3 Estructura del grano de maíz

Los granos de maíz se desarrollan mediante la acumulación de los productos de la fotosíntesis, la absorción a través de las raíces y el metabolismo de la planta de maíz en la inflorescencia femenina denominada espiga. Esta estructura puede contener de 300 a 1 000 granos según el número de hileras y el diámetro y longitud de la mazorca. El peso del grano puede variar mucho, de aproximadamente 19 a 30 g por cada 100 granos.

El grano de maíz se denomina en botánica cariósipide o cariopsis; cada grano contiene el revestimiento de la semilla, o cubierta seminal, y la semilla, como se ve en la Figura 25 y 26, en la figura se muestran también las cuatro estructuras físicas fundamentales del grano: el pericarpio, cáscara, o salvado; el endospermo; el germen o embrión; y la piloriza o pedicula (tejido inerte en que se unen el grano y el carozo). Las partes botánicas de la cariósipide del maíz, son semejantes a las que se encuentran en el trigo. El grano de maíz es de color muy variable, que se observa se deben a las antocianinas, compuestos presentes en el pericarpio, en la capa de aleurona o en ambas estructuras del grano puede ser de color uniforme o variado que abarca desde el blanco al pardo oscuro o púrpura. El salvado constituye el 5-6% del grano; el germen es relativamente

grande: un 14 % del grano aproximadamente y el resto corresponde al endospermo. A diferencia del trigo, dentro del mismo grano de maíz se encuentra endospermo traslucido y opaco. El endospermo traslucido es muy compacto, sin espacios aéreos, los granulos de forma poliédrica se mantienen unidos unos a otros con una matriz protéica, estos se han identificado como *cuerpos de zeina*, en el endospermo opaco los granos de almidón son esféricos y la matriz protéica que los recubre está exenta de cuerpos de zeina, que suele ser llamado endospermo "blando". Los granos de almidón de las partes opaca y translucida del endospermo tienen forma diferente: una posible explicación del hecho de que en un mismo grano se encuentren dos tipos de almidón es que durante el proceso de desecación natural, la proteína pierde agua y se encoje. La adherencia entre la proteína y el almidón es suficientemente fuerte para apretar los granulos más y más los unos contra los otros. En esta etapa, los granulos de almidón son flexibles y, como son comprimidos fuertemente, adquieren una forma poliédrica. Durante la desecación, se rompen los enlaces proteína-proteína formándose espacios aéreos intergranulares y granos de almidón esféricos (Hoseney, 1996).

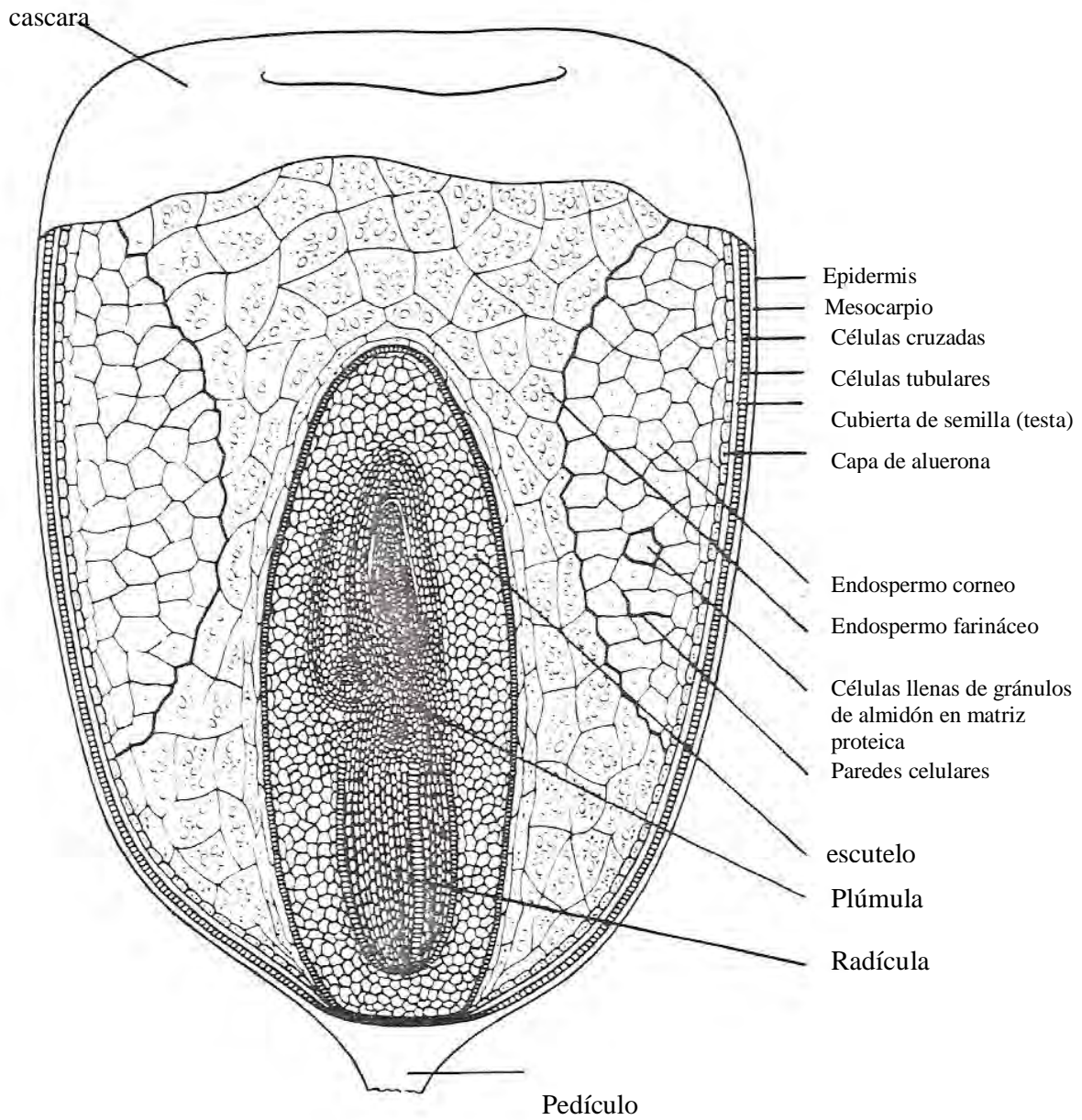


Figura 25 Estructura del grano de maíz corte transversal (Hoseney, 1996).

Tabla 7 Clasificación por tipo de maíz (Conca, 2008).

TIPOS DE MAIZ		
Tipo	Características	Uso
Amarillo	Tipo de maíz más producido a nivel mundial Alto contenido de carotenoides en el endospermo	Canalizado hacia alimentación animal Preferidos por la industria refinadora de almidón
Blanco	Bajo contenido de carotenoides en el endospermo	Industria alimentaria productora de harinas, botanas y pan.
Azul y morado	Endospermo blanco y suave con alta pigmentación en la aleurona	Botanas y platillos típicos.
Dentado	Posee una hendidura en la corona de la cariósida, lo que le da la forma dentada Endospermo amarillo y suave	Alimentación animal
Cristalino	Forma esférica o lagrimal sin hendidura Granos más pequeños y densos que los dentados Textura vítrea Color blanco o amarillo	General
Palomero	Grano pequeño Textura del endospermo casi totalmente cristalina Pericarpio grueso de color amarillo o blanco	Seleccionado por su poder de expansión Elaboración de palomitas
Ceroso	Dentados y amarillos Bajo contenido de amilasa (<0 – 5%) Endospermo de aspecto ceroso	Industria refinadora de almidón
Alto en amilosa	Poseen hasta 50% amilosa No se siembran comercialmente todavía Altamente resistentes al cocimiento	Potencialmente para ser usados para cereales de desayuno o botanas
Alto en lisina	Maíz mutante con endospermo suave con una menor proporción de prolaminas o zeínas Contienen casi el doble de lisina y triptofano (4.3 y 0.9% respectivamente) Mejor valor nutritivo para humanos y animales domésticos monogástricos	
Pozolero o cuzco	Granos grandes y dentados Color blanco Endospermo suave y harinoso	Producción de botanas, pozole y otros platillos típicos

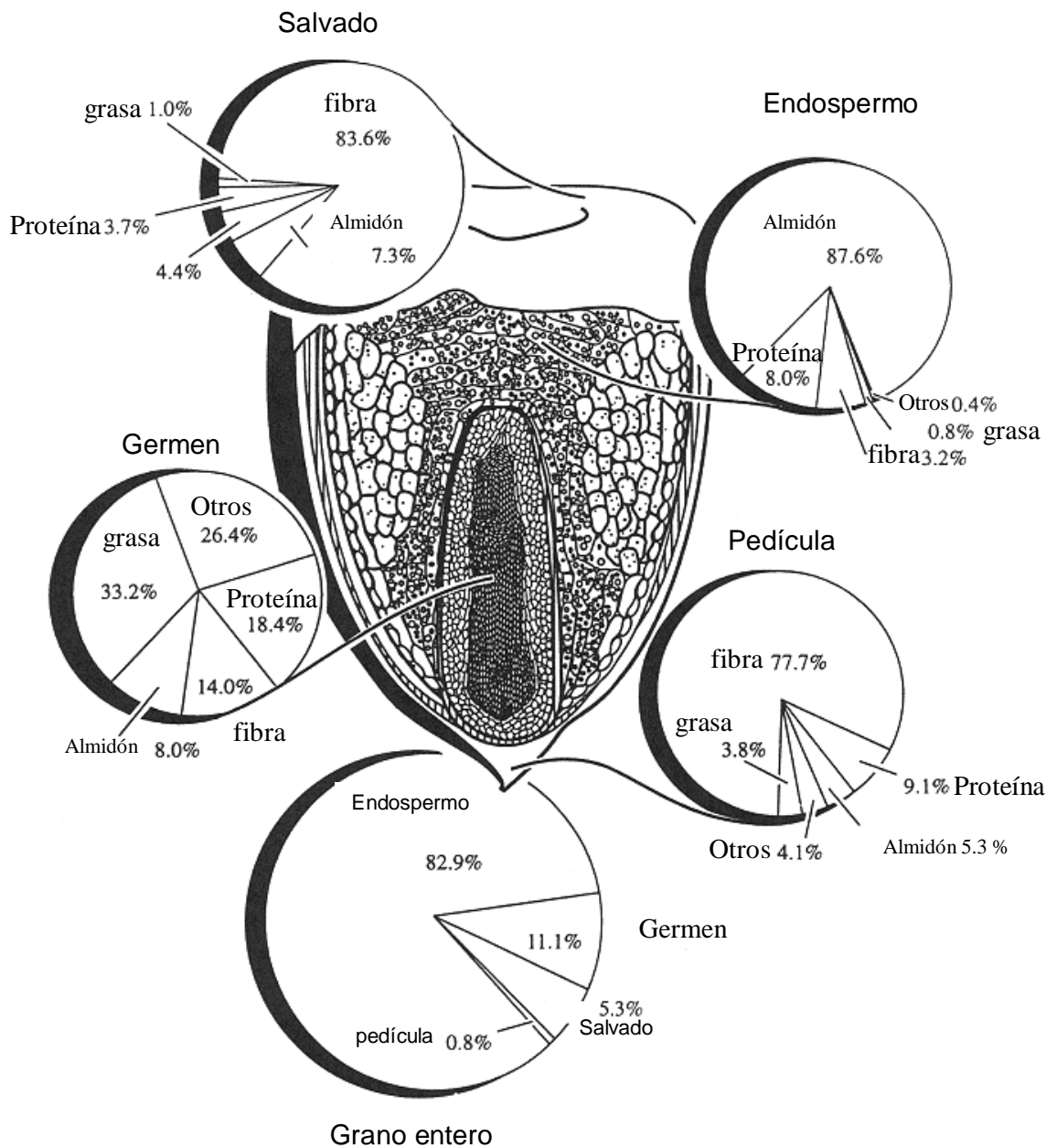


Figura 26 Composición del grano de maíz y sus partes anatómicas (Kulp, 2000).

2.12.4 Aplicaciones del maíz

El maíz es un grano que tiene gran cantidad y diversidad de aplicaciones alimentarias e industriales. De particular importancia resulta su condición de materia prima renovable. La diversidad de aplicaciones requerirá de características específicas en la calidad de los diferentes granos que se pueden presentar, muchas de las cuales podrían obtenerse

mediante mejoramiento genético mediante cruces entre las diferentes variedades que es algo que se ha hecho en Latinoamérica y que se mantienen a través del tiempo.

Además, este grano es una importante fuente de materia prima para producir almidón y derivados, como edulcorantes, aceite, alcohol, entre otros. Estos últimos pueden ser, y en cierta medida ya lo están siendo, utilizados como materia prima en la industria química, y en algunos casos como reemplazo de los derivados del petróleo que a diferencia de este, el maíz presenta ciertas ventajas ya que es un recurso renovable, los productos finales obtenidos son biodegradables y su degradación no altera el balance de anhídrido carbónico atmosférico.

La calidad de uso del maíz está determinada principalmente por la estructura y composición del grano. Las diferencias en estructura y composición dependen del cultivar así como de las prácticas de manejo, el clima, el suelo y los métodos de cosecha y poscosecha.

Las aplicaciones del almidón son múltiples. La modificación (ya sea por tratamientos químicos o por mejoramiento genético) para alterar sus propiedades funcionales amplían aun más el campo de aplicación. La alteración en las proporciones relativas de amilosa y amilopectina modifica el grado de ramificación del almidón lo que origina variaciones en sus propiedades funcionales y por lo tanto en su espectro de usos. El almidón puede ser vendido como nativo o después de ser modificado por calor, productos químicos, enzimas, o puede ser convertido en azúcares para su uso como edulcorantes o sustratos como la fermentación. Unos de los principales usos alimentarios para el almidón incluyen complementos en la elaboración de la cerveza, los productos químicos, medicamentos y productos farmacéuticos, los agentes de control en la viscosidad de conservas, productos de confitería a base de almidón, y aplicaciones de panadería. Los almidones se utilizan en los alimentos como estabilizadores, espesantes, agentes de control de la viscosidad, y gelificantes. Además de las aplicaciones adicionales en alimentos de los almidones de maíz nativo y modificado, la producción de almidón se utiliza en aplicaciones industriales no alimentarias incluyendo adhesivos en papel, materiales de construcción, revestimientos, calibres de productos textiles y de papel. Siendo esta una de las plantas más estudiadas en el mundo y el progreso continuo en el aumento de la productividad y los avances en la utilización de maíz aseguran la importancia del maíz en el suministro de alimentos, piensos y productos industriales, que son tan importantes para los niveles de vida en los países desarrollados. El potencial de productos de maíz para reemplazar los que actualmente son derivados de los recursos no renovables, como petróleo y minerales, y que poseen propiedades del medio ambiente aumentará la demanda de maíz en

productos no alimentarios, productos industriales (plásticos, materiales de construcción, etc.) Los avances en la fermentación y recuperación de producto pueden proporcionar las bases para un crecimiento sustancial en el suministro de materias primas y especialidades químicas (Kulp-Ponte 2000).

La utilización de maíz se puede dividir entre los empleos que implica el consumo casi directo con una preparación mínima y las relativas a una transformación sustancial del valor añadido. Por ejemplo, el maíz puede ser utilizado directamente por el ganado para producir carne y productos lácteos, el principal medio de agregar valor. Usos directos del maíz como alimento incluyen el maíz dulce, palomitas de maíz, masa nixtamalizada, y los alimentos a base de maíz entero o tradicional de piedra de moler. Otras maneras de utilizar maíz involucrar uno o más niveles de procesamiento de valor agregado. Estos incluyen las industrias de transformación:

1^{er} nivel los procesos de fraccionamiento, el que el maíz se separan en sus fracciones de componentes para su uso como ingredientes en los alimentos o productos industriales de consumo, como la molienda húmeda y seca.

2^{do} nivel los procesos de conversión, que convertir una fracción en los ingredientes más valiosa o productos industriales, tales como la conversión enzimática del almidón en azúcar o en la fermentación del azúcar en etanol.

3^{er} nivel procesos refabricación, que se recombinan los productos de maíz con otros ingredientes para producir los alimentos o productos industriales.

El aceite es un componente menor del grano de maíz, siendo su concentración de alrededor del 5%. Por selección se consigue aumentar esa concentración hasta más del 20%. La composición de ácidos grasos determina, en gran medida, la calidad del aceite de maíz. Las distintas proporciones de estos ácidos establecen las propiedades de uso más adecuado del aceite, ya sea en alimentación humana o animal. La relación de ácido oleico a linoleico parece ser de herencia simple y la obtención de tipos con alto así como bajo contenido de oleico es factible (Robutti, 2004)

Un alto nivel de ácidos grasos poliinsaturados se afirma que es ventajosa para la dieta y la salud. Un nivel bajo de ácido linolénico y altos niveles de los tocoferoles antioxidantes naturales dan a los aceites de maíz una estabilidad inusual a la rancidez oxidativa. El alto punto de humo y bajo punto de solidificación hacen que los aceites de maíz sean ideales para la cocción y como aceites para ensalada (Robutti, 2004).

Tabla 8 Producción nacional anual de maíz (SAGARPA 2008)

Cultivo	Sup. Sembrada	Sup. Cosechada	Producción	Rendimiento	PMR	Valor Producción
	(Ha)	(Ha)	(Ton)	(Ton/Ha)	(\$/Ton)	(Miles de Pesos)
Maiz Forrajero	499,396.68	483,608.94	12,794,819.83	26.46	363.98	4,657,012.53
Maiz Grano	7,942,285.23	7,344,345.64	24,410,278.53	3.32	2,817.04	68,764,850.61
Maiz Grano Semilla	1,470.00	1,470.00	11,400.00	7.76	3,185.26	36,312.00
Maiz Palomero	685	685	1,954.20	2.85	6,000.00	11,725.20

Tabla 9 Producción anual de maíz estado de Tlaxcala (SAGARPA 2008)

Cultivo	Sup. Sembrada	Sup. Cosechada	Producción	Rendimiento	PMR	Valor Producción
	(Ha)	(Ha)	(Ton)	(Ton/Ha)	(\$/Ton)	(Miles de Pesos)
Maiz Grano	115,065.00	114,386.00	311,567.75	2.72	2,693.36	839,164.13
Maiz Forrajero	9,030.00	9,030.00	355,577.02	39.38	398.75	141,787.21

Tabla 10 Producción anual de maíz municipio de Ixtenco (SAGARPA 2008)

Cultivo	Sup. Sembrada	Sup. Cosechada	Producción	Rendimiento	PMR	Valor Producción
	(Ha)	(Ha)	(Ton)	(Ton/Ha)	(\$/Ton)	(Miles de Pesos)
Maíz Grano	20	20	760	38	300	228
Maíz Forrajero	1,740.00	1,740.00	5,297.25	3.04	2,800.00	14,832.30

2.13 Estado de Tlaxcala

El Estado de Tlaxcala se localiza geográficamente en la región centro-oriental de la República Mexicana entre los 97°37'07'' y los 98°42'51'' de longitud oeste y los 19°05'43'' y los 19°44'07'' de latitud norte situado en las tierras altas del eje neovolcánico, sobre la meseta de anáhuac

Colinda al norte con los estados de Hidalgo y Puebla; al este y sur con el estado de Puebla; al oeste con los estados de Puebla, México e Hidalgo. Es el estado de la

Federación con menor superficie ya que su extensión territorial es de 3 987.943 kilómetros cuadrados, lo que representa el 0.2 por ciento del territorio nacional.

Su altitud media es de 2 230 metros sobre el nivel del mar, por lo que su clima es templado-subhúmedo, semifrío- subhúmedo y frío.

Las precipitaciones medias anuales son mayores en el centro y sur, donde van de 600 a 1 200 milímetros, en tanto que en el noroeste y oriente las lluvias son menores de 500 milímetros al año.

En la producción agrícola destacan el maíz y la cebada como principales productos; le siguen en orden de importancia el trigo, maíz forraje, avena forraje, papa, haba, alfalfa y otros cultivos. Las principales explotaciones pecuarias son: bovinos para la explotación de carne, leche y de lidia; porcinos, equinos, caprinos, aves y colmenas.

El paisaje de Tlaxcala esta compuesto de extensos llanos que se alternan con sierras y edificios volcánicos y con lomeríos formados también por rocas ígneas extrusivas.

Su vegetación es la propia de los climas fríos o templados, con especies resistentes a las bajas temperaturas, tales como el pino, el oyamel, el encino y el enebro.

En la región boscosa de la Malintzi predomina el pino, aunque también se encuentra el encino. En las planicies, cuyos suelos son poco húmedos se da el maguey y el nopal.

<http://www.tlaxcala.gob.mx>

2.14 Municipio de Ixtenco

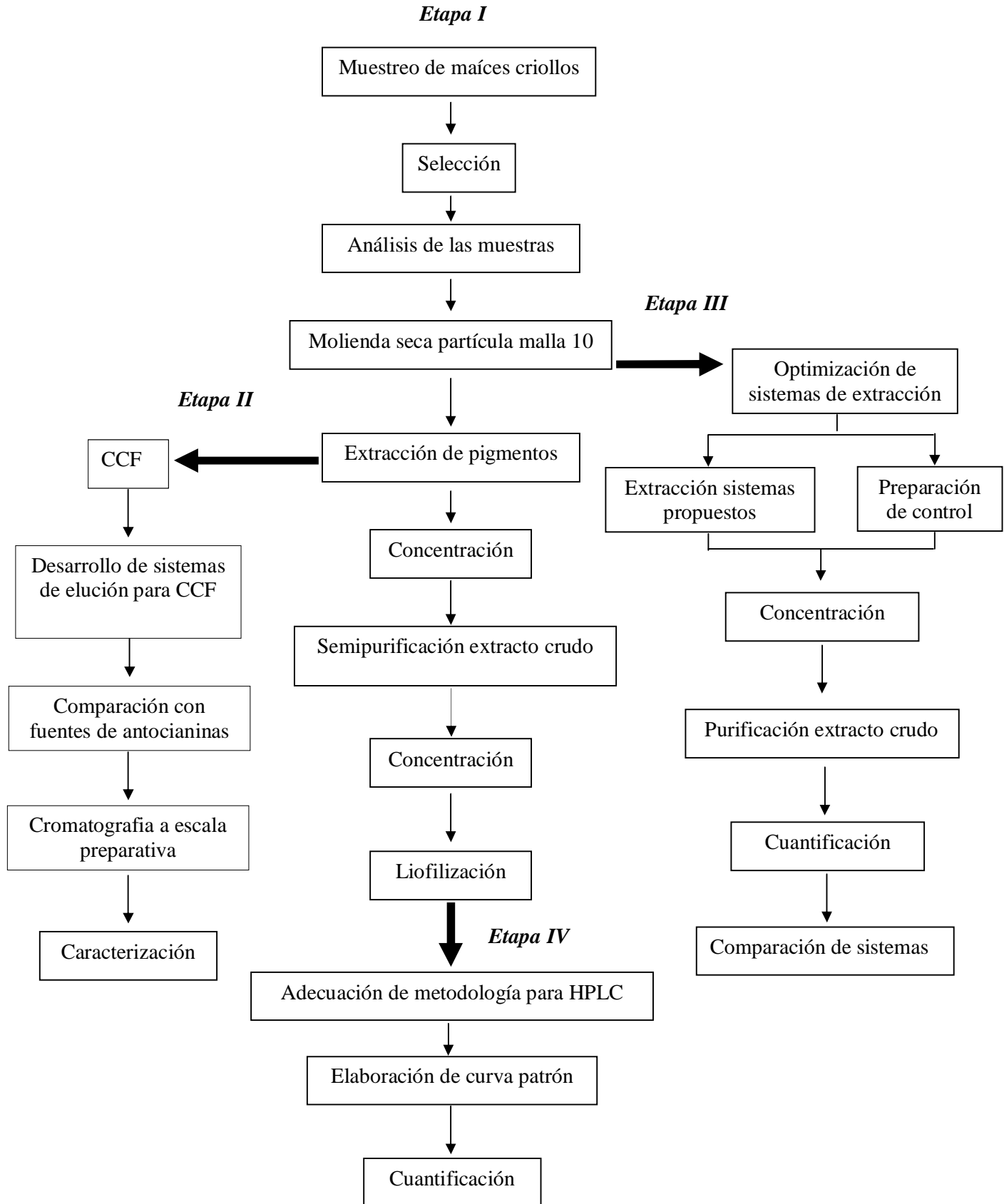
El nombre del municipio proviene de la lengua náhuatl y significa en la rivera o en la orilla. Ixtenco, deriva de los vocablos ixtli, que quiere decir ojo, superficie y tentli, que se traduce como labio u orilla, así como de la terminación co, que denota lugar. Ubicado en el Altiplano central mexicano a 2 500 metros sobre el nivel del mar, el municipio de Ixtenco se sitúa en un eje de coordenadas geográficas entre los 19 grados 15 minutos latitud norte y 97 grados 53 minutos longitud oeste. Localizado en el oriente del estado, el municipio de Ixtenco colinda al norte con el municipio de Huamantla, al sur colinda con el

municipio de Trinidad Sánchez Santos, al oriente con el estado de Puebla y, por último, al poniente con Huamantla e igualmente con Trinidad Sánchez Santos www.ixtenco.gob.mx.



Figura 27 Mapa del estado de Tlaxcala <http://www.explorandomexico.com.mx>

Capítulo 3 Metodología Diagrama General



3.1 Etapa I

3.1.1 Muestreo

Se recolectaron 25 variedades de maíz criollo (500 g de cada variedad) directamente con un productor de la localidad de Ixtenco, Estado de Tlaxcala, México, las muestras fueron recogidas de la cosecha 2009, cultivada con el método de siembra de temporal. Se eligió esta localidad de entre los 60 municipios que conforman el Estado de Tlaxcala debido a que esta localidad es conocida por la variedad de granos de color que se presentan en la región.



Figura 28. Localización de Ixtenco en el estado de Tlaxcala
http://www.ixtenco.gob.mx/localizacion_ixt.html

3.1.2 Selección

En total se colectaron 25 variedades de maíz criollo en la localidad, de esa muestra total se hizo una selección en la que se descartaron las variedades de tonos amarillos y blancos, ya que la presencia de antocianinas en estos maíces es prácticamente nula. Los granos se recolectaron poco después de la cosecha. Se les realizó una inspección buscando impurezas y daños en el grano.

Posteriormente se hizo una re-selección utilizando 2 criterios:

- 1) Intensidad de color.
- 2) Coloración en toda la superficie del grano.

Estos 2 criterios se establecieron con base en que algunos maíces sí presentaban coloración, pero de poca intensidad y en tonos muy suaves, algunos otros maíces presentaban coloraciones muy intensas mas no sobre toda la superficie del grano o se encontró de una manera poco homogénea, p. ej.: los maíces llamados *gato* presentaban coloraciones muy intensas en forma de líneas sobre el pericarpio, pero no cubrían mucha extensión del mismo (figura 32). Estos criterios se tomaron en cuenta por lo descrito en la literatura (Cuevas, 2008 y Salinas Moreno, 2004).

Maíces coloridos

Maíces con poca coloración

Negro



Gorrion



Rojo Matizado



Melón



Figura 29 Coloración de los maíces muestreados

3.1.3 Preparación de las muestras

3.1.3.1 Molienda seca

Al ser difícil el acceso a una maquina perladora, para trabajar únicamente con el pericarpio, se realizo una molienda seca de 200 gramos de cada maíz en licuadora marca Oster de una velocidad, con pulsos de molido de 60 segundos, dejando reposar otros 60 segundos entre los pulsos para evitar el calentamiento del grano , hasta llegar a un tamaño de partícula de malla 10. Estos “polvos” se etiquetaron y se almacenaron en un ultracongelador Harris a -79°C hasta su análisis.

3.1.3.2 Extracción de pigmentos

La extracción se realizo colocando 50 g de cada polvo de maíz de Ixtenco así como 2 variedades coloridas de los estados de Hidalgo y Michoacán como controles ya que hay estudios previos de estos tipos de maices en un matraz Erlen - Meyer de 125 ml, con 80 ml de metanol grado reactivo con 19 ml de agua destilada y 1 ml de ácido de acido acético grado reactivo, en agitación durante 24 horas a 100 r.p.m en temperatura ambiente por triplicado en un agitador orbital Lab-line. De acuerdo con lo descrito por Salinas et. al. 2005. Como acidificante se opto por el acido acético, ya que al utilizar un ácido más fuerte se pueden hidrolizar algunos copigmentos intramoleculares de las antocianinas contenidas en la mezcla de extracción. Este extracto se concentro en un rotavapor Buchi R-215 con control de vacio a una temperatura menor a 40 °C hasta un volumen aproximado de 10 ml eliminando totalmente el metanol.

3.1.3.3 Semi-purificación

El extracto se llevo a un embudo de separación donde se agrego agua destilada y acetato de etilo con un volumen de 20 ml aprox. para remoción de sustancias con menor polaridad, y se realizaron extracciones sucesivas hasta obtener la fase orgánica transparente en su totalidad. Una vez finalizada esta etapa se reconcentra la fase acuosa en rotavapor con las condiciones antes descritas a un volumen de 10 ml aproximadamente. (Ramírez-Quiñones 2007).

3.1.3.4 Liofilización

Para lograr la que sequeidad total el extracto se coloco en frascos previamente pesados y estos se colocaron en vasos para liofilizadora seguido de estos se congelaron en ultracongelador colocándolos de manera inclinada para facilitar su manipulación posterior (a -80°C) con tapas de parafilm perforados con el fin de evitar migración por efecto del vacio y se llevaron a una liofilizadora Labconco a -80 °c y 45×10^{-5} mbar de presión hasta sequeidad total, una vez hecho esto se vuelven a pesar los frascos.

3.2 Etapa II

3.2.1 Cromatografía en capa fina para la obtención de estándares.

Al utilizar los sistemas descritos en la literatura, que se expondrán más adelante, no se obtuvieron buenos resultados, entonces se procedió al desarrollo de un sistema de elución que permitiera la separación e identificación cualitativa de las antocianinas.

3.2.2 Desarrollo de Sistema de Cromatografía en Capa Fina

Los sistemas ya descritos en la literatura, se muestran a continuación:

(Froehlicher et. al. 2009)

- “HFW” HCl/HCOOH/H₂O: 21/38/41 (v/v) placas de celulosa
- “BAW” n-BuOH/AcOH/H₂O 4/1/5 (v/v), placas de celulosa
- “Forestal”:AcOH/ conc HCl/H₂O: 30/3/10 (v/v), 60% AcOH, placas de celulosa
- Tolueno/acetona/agua: 3/3/1 (v/v). placas de silica gel en aluminio.

Para el desarrollo del Sistema de Cromatografía en Capa Fina se realizaron ensayos en soportes de silica en aluminio y en vidrio, celulosa, celulosa microcristalizada y en fase reversa.

Se introdujeron otros solventes polares como: metanol, alcohol isoamílico y otros con polaridad media como: el acetato de etilo, cloroformo en diferentes proporciones. Para estos ensayos se utilizo un extracto de maíz negro a partir de 50 g de polvo obtenido previamente, cada uno con placas de los diferentes soportes de 6 x 4 cm aprox.

A continuación se muestran algunos ejemplos de estos:

Tabla 11 Ejemplo de sistemas de elución probados durante esta investigación

Acetato de etilo : metanol: agua 5:3:1 v/v

Acetato de etilo : metanol: etanol : agua 3:3:2:1 v/v

Acetato de etilo : metanol: agua 2:3:1 v/v

Acetato de etilo : metanol: cloroformo 3:0.5:1 v/v

Acetato de etilo : metanol: agua 3:0.5 : 0.5 v/v

Acetato de etilo : metanol: agua: cloroformo 3:1:1.0.5 v/v

Finalmente se llegó a un sistema adecuado para la identificación y la posible obtención de estándares el cual fue el *Acetato de etilo: metanol: agua (3:2:1) al que se llamo 321 en silica en aluminio.*

3.2.3 Comparación con fuentes de antocianinas conocidas

Con el Sistema Adecuado de Cromatografía en Capa Fina se procedió a hacer una identificación cualitativa a través de una fuente conocida de antocianina, como la ciruela, que contiene mayoritariamente cianidina-3-glucosido (Delgado-Paredes 2003) y extractos de maíz azul nixtamalizado, que contiene mayoritariamente cianidina-3-glucosido y pelargonidina-3-glucosido. (Cortez-Salinas 2006), esto se realizó en una placa de silica gel de 20 x 10 cm con los siete maíces seleccionados para esta investigación.

3.2.4 Cromatografía a escala preparativa (mg)

Se realizó una cromatografía a escala preparativa con extractos de maíz nixtamalizado, con la finalidad de obtener estándares, aunque por dificultades ajenas al laboratorio no se pudo realizar la caracterización espectroscópica.

3.3 Etapa III

3.3.1 Optimización del sistema de extracción

Ya una vez obtenido el Sistema de Elución para la identificación y la posibilidad de obtener estándares para la medición en HPLC, se procedió a optimizar los sistemas de extracción, utilizando diferentes sistemas.

3.3.2 Extracción con sistemas propuestos

Para lograrlo se utilizaron 25 g de polvo de maíz negro, se colocó en matraces Erlenmeyer de 125 ml agregando los diferentes sistemas propuestos:

Tabla 12 Sistemas propuestos para la extracción

Metanol	100 v/v
Etanol	100 v/v
Agua	100 v/v
Etanol:Agua	50:50 v/v
Etanol:Agua	80:20 v/v

Cada sistema se probó con un acidificante diferente al ácido acético a los cuales por cuestiones de patente llamaremos ácido A, B, C y D con un 2% respecto al volumen total

3.3.3 Preparación del control

Paralelamente se realizó una extracción 25 g de polvo de maíz negro en matraces Erlenmeyer de 125 ml utilizando como referencia un sistema base con metanol: agua: ácido acético (80:18:2 v/v); se seleccionó este maíz debido al que era con el que se contaba en mayor cantidad. La extracción se realizó a temperatura ambiente a 100 r.p.m durante 12 horas, una vez pasado este tiempo en agitación se concentró en rotavapor a no más de 40 grados centígrados hasta un volumen de entre 8-10 ml, seguido de esto se realizó la extracción líquido-líquido antes descrita, para su purificación

3.3.4 Cuantificación de antocianina total monoméricas

Para realizar la cuantificación se preparó un buffer a pH 1 de cloruro de potasio 0.025M ajustando con HCl y el buffer a pH 4.5 de acetato de sodio 0.4M ajustando con ácido

acético. A 200 µL de extracto se le agregaron 800 µL de un buffer y se tomaron las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro.

Debido a que las antocianinas pueden estar en diferentes estructuras reversibles cambiando su pH, también pueden tener cambios en sus espectros de absorción, por lo que la concentración de antocianina monomérica se determinó por el método de pH-diferencial. Este método permite una medición rápida y precisa de las antocianinas totales, aún en presencia de pigmento degradado polimerizado o en presencia de cualquier otro compuesto interferente.

Por lo tanto para determinar la concentración de antocianinas por este método se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de Antocianina (mg L)} = [A / EL] * [1000] * [PM] * [FD]^{-1}$$

Donde:

$$A = (A_{\text{pH } 1 \text{ } 510} - A_{\text{pH } 1 \text{ } 700}) - (A_{\text{pH } 4.5 \text{ } 510} - A_{\text{pH } 4.5 \text{ } 700})$$

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

L = Longitud de la celda, cuyo valor es de 1.

PM de la antocianina de mayor concentración en la materia prima. Se toma la cianidina-3-glucósido y su peso molecular es de 449.2 g mol.⁻¹:

Para cada muestra se hizo un barrido espectral de 400 a 700 nm y se tomaron los valores de absorbancia máxima de 510 aproximadamente (absorbancia de la antocianina) y 700 nm (lectura de grado de degradación del compuesto y lectura de corrección debido a sustancias interferentes). Este procedimiento se realizó tanto a pH 1 como a pH 4.5 en celdas de plástico de 1 ml. La absorbancia máxima observada se tomó en el rango menor a 1, siendo alrededor de 0.6 el óptimo. Como solución blanco se empleó agua destilada. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro GBC Cintral.

3.3.5 Comparación de antocianina total extraída entre sistemas y con el control

Una vez que realizaron las mediciones y los cálculos de antocianina total se realizó una comparación del promedio y de la desviación estándar de los sistemas propuestos con el control.

3.4 Etapa IV

3.4.1 Adecuación de la metodología para HPLC

Para la cuantificación por HPLC, se adecuó el método propuesto por Fossen et al (1999), modificando una de las fases móviles en lugar de ácido fórmico se utilizó ácido acético, se efectuaron diferentes ensayos con los tiempos y velocidades de flujo por las características de la columna que se empleó, ya que no soportaba las condiciones del trabajo anteriormente citado. Llegando al siguiente método: un flujo de 1.2 ml/min. con un gradiente de 60% de B hasta 100% durante 15 minutos seguido de un flujo isocrático de 100% de B durante 3 minutos y finalmente por un gradiente lineal de 100% B hasta 100% de A durante 27 minutos. Las fases móviles de disolventes fueron A) ácido acético: agua (10:90) B) metanol: agua: ácido acético (50:40:10v/v).

3.4.2 Elaboración de curva patrón y cuantificación por HPLC

Las curvas se realizaron en un HPLC 1525 Waters con bomba binaria, desgasificador externo y lector UV Waters 2487 Dual.

Los equipos fueron controlados con una computadora Dell con software breeze 3.0. La columna analítica empleada fue una Thermo scientific ODS hypersil (200 x 5 mm). Se utilizaron los estándares comerciales de pelargonidina-3-glucósido (1mg) y cianidina-3-glucósido (1mg), (Sigma-Aldrich) con las condiciones previamente descritas. El mismo sistema se utilizó para los extractos de los diferentes maíces por triplicado. Curvas en apéndice I.

3.4.3 Cuantificación

Finalmente se llevó a cabo la cuantificación con las muestras liofilizadas en la etapa uno de los diferentes maíces en el equipo de HPLC por triplicado.

Capítulo 4 Resultados y discusión

4.1 Selección

A continuación se muestran los 7 maíces seleccionados para su análisis



Maíz Negro



Maíz moradilla



Maíz Rojo Matizado



Maíz violeta



Maíz azul punta roja



Maíz Tlaxonole



Maíz coral

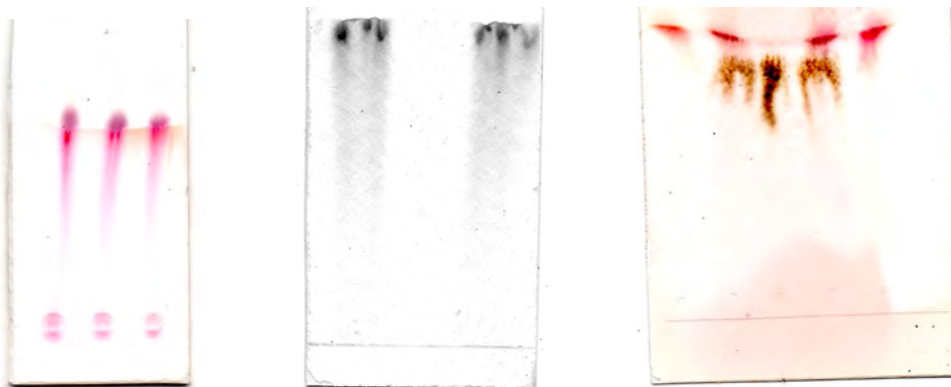
Figura 30 Maíces coloridos seleccionados de la muestra total

En la figura 32 se pueden observar los diferentes tonos de color que se pueden encontrar en estos maíces, tonos que van desde los rojizos intensos hasta los suaves y tonos azul-violáceos. Estos maíces provienen de mazorcas pequeñas de entre 10 y 15 centímetros aproximadamente de plantas de 1.60 -1.70 metros en promedio, cabe aclarar que estos maíces son sembrados en pequeños solares de terrenos que son destinados por los productores para la siembra y que son ocupados generalmente para autoconsumo más que para ser comercializados, con excepción de los maíces de colores azules. Una vez cosechados se desgranar y al ser poca la producción se almacenan en canastas de mimbre con capacidad de entre 10 y 15 kg c/u y almacenados en silos tradicionales o bodegas con poca luz ya que los granos pierden coloración al estar expuestos a la luz. Durante el muestreo se realizó una inspección buscando impurezas y granos dañados las cuales fueron satisfactorias ya que los mismos productores al desgranar van descartando los granos dañados, antes de almacenarlos.

Después de esta selección se realizó una molienda seca a cada tipo de maíz las cuales se etiquetaron y almacenaron en congelación, posterior a la molienda se realizó una extracción al polvo de maíz negro para la obtención de estándares en cromatografía en capa fina y su identificación cualitativa.

4.2 Cromatografía en capa fina

Los resultados obtenidos por los métodos de elución descritos no fueron satisfactorios para la separación de las antocianinas ya que no cumplían con una separación óptima, como se muestra en la siguiente figura:



A Fase reversa

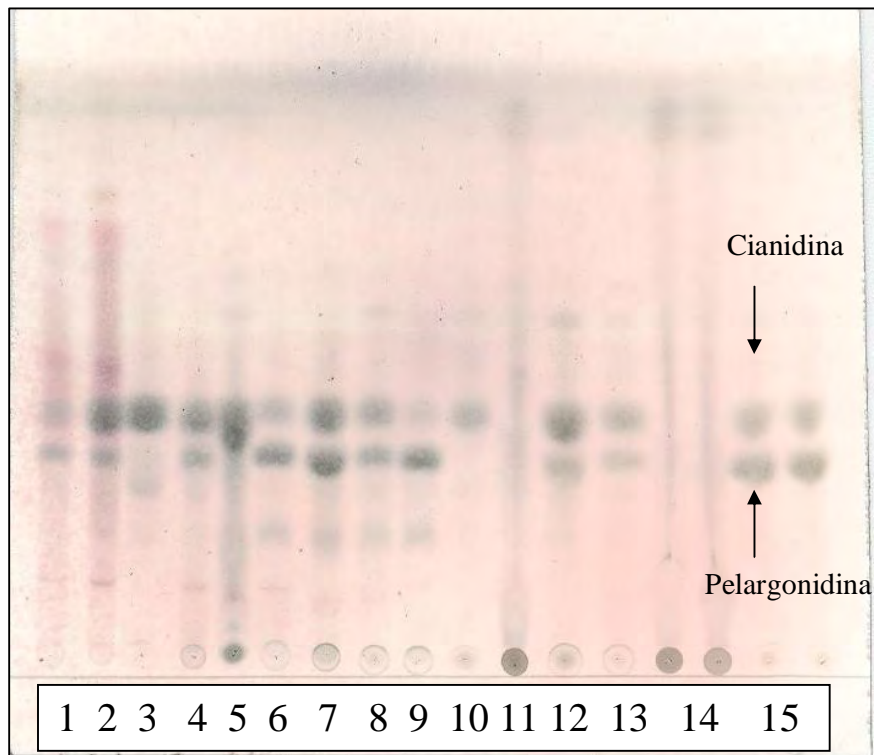
(B) BAW celulosa

(C) BAW celulosa
microcristalizada

Figura 31 Cromatografía con los sistemas descritos en la literatura

En estos sistemas la falta de separación de las antocianinas pudo ser debida a que la extracción no se realizo únicamente con el pericarpio sino con un polvo similar a una harina que contenía todos los componentes de los granos aceite, azúcares solubles fibra proteínas, pudiendo ser este el factor que impidiera la separación de estas por los métodos ya reportados.

Al obtener un nuevo sistema de elución 321 véase *metodología sección 3.2.2* que ofrece buenos resultados de separación de las antocianinas y así poder determinar su perfil de manera cualitativa, se procedió a realizar una cromatografía en capa fina con los diferentes maíces y fuentes conocidas de antocianinas para su identificación cualitativa, con la siguiente placa:



- | | |
|----------------------------|---|
| 1 Maíz negro | 8 Violeta |
| 2 Raspaduras de pericarpio | 9 Moradilla |
| 3 Ciruela | 10 Maíz azul (Hidalgo) |
| 4 Berenjena | 11 Betabel |
| 5 Rojo matizado | 12 Maíz rojo (Michoacán) |
| 6 Tlaxonole | 13 Maíz azul (Hidalgo) |
| 7 Azul punta roja | 14 Maíz azul sin extracción líquido-líquido |
| | 15 Maíz Nixtamalizado |

Figura 32 Cromatoplaqueta con el sistema de elución 321 que se desarrolló en esta investigación.

En la figura 32 se pueden observar dos manchas con los mismos R_f para los maíces seleccionados que coinciden con las manchas que aparecen en los carriles de la ciruela (carril 3) que tiene como antocianina mayoritaria a la cianidina-3-glucósido (Socaciu 2008) y el maíz nixtamalizado que según el reporte de Cortez (2006) donde la concentración de antocianinas monoméricas de cianidina-3-glucósido y pelargonidina-3-glucósido aumenta en los extractos de maíces coloridos nixtamalizados mientras que las antocianinas con acilaciones disminuyen, esto se observó en los carriles con número 15 ya que no presentan estelas muy marcadas durante su elución y la correspondencia con la mancha

que se observa en el carril 3 que corresponde a la ciruela que contiene mayoritariamente cianidina-3-glucósido, lo cual nos presentaba una evidencia cualitativa de la presencia de esta, por otra parte se observa, una coincidencia con los maíces rojo de Michoacán y azul del estado de Hidalgo (carril 12 y 13), que se utilizaron como un comparativo ya que como lo reporta *Salinas-Hernandez 2005* existen las antocianinas pelargonidina-3-glucósido y cianidina-3-glucósido en maíces coloridos de estas regiones. Cabe mencionar que en este mismo estudio se encuentra también la antocianina peonidina-3-glucósido de manera significativa, por lo que se podría esperar su presencia en estos maíces pero al no tener una fuente natural diferente al maíz que pudiera servir como comparativo o un estándar comercial no se pudo comprobar a través de la cromatografía en capa fina. En la cromatoplaqueta también se incluyeron extractos de berenjena que contiene mayoritariamente derivados acilados de la antocianina delphinidina; así como extractos de betabel, a manera de control y comparación, ya que el betabel contiene betalainas que son generalmente de color rojo y no se han encontrado antocianinas y betalainas juntas en alguna fuente natural (PROFITOCOOP, 2008).

Una vez que se tenía el sistema de elución se llevo a cabo una cromatoplaqueta preparativa con extractos de maíz nixtamalizado, dando como resultado la separación de las probables antocianinas, las cuales no se pudieron caracterizar ni verificar su pureza debido a circunstancias ajenas al control del laboratorio.

4.3 Optimización del sistema de extracción

Una vez realizada la identificación cualitativa se realizaron cambios en los sistemas de extracción con la finalidad de compararlos ya que podrían mejorar la extracción de las antocianinas (*véase metodología 3.3.2.*) y se obtuvieron los siguientes resultados :

Tabla 13 Antocianina total con acido A

Sistema acido A	Media(mg/100 g harina)	Desviación estándar
Metanol I	0.890	0.791
Etanol II	0.094	0.150
Agua III	1.182	1.235
EtOH/H2O 50:50 IV	2.215	0.244
EtOH/H2O 80:20 V	0.744	1.063
Sistema control	Media	Desviación estándar
metanol/agua 80:20	3.931	0.480

Tabla 14 Antocianina total con acido B

Sistema acido B	Media(mg/100 g harina)	Desviación estándar
Metanol I	0.162	0.278
Etanol II	0.278	0.162
Agua III	6.728	0.278
EtOH/H2O 50:50 IV	2.089	6.728
EtOH/H2O 80:20 V	1.230	2.089
Sistema control	Media	Desviación estándar
metanol/agua 80:20	3.931	0.480

En general para los ácidos A y B (tabla 13 y 14) se puede observar una baja o nula concentración de antocianina extraída, en comparación con el control, esto pudo deberse a que las características estructurales de estos ácidos pueden presentar reacciones de formación de complejos las cuales pueden provocar interferencia en las lecturas espectrofotométricas. Sin embargo utilizando el sistema donde solo se emplea agua con el acido B (tabla 14) se obtiene una buena extracción pero con el inconveniente de que la extracción liquido- liquido (*véase metodología 3.1.3.3*). se tiene que realizar cuatro o cinco veces a diferencia de los otros sistemas en los que solo se realiza máximo tres veces lo que lo vuelve una desventaja por el aumento en el uso del disolvente de la extracción líquida.

Tabla 15 Antocianina total con acido C

Sistema acido C	Media (mg/100 g harina)	Desviación estándar
Metanol I	4.595	3.013
Etanol II	1.856	0.773
Agua III	1.418	0.320
EtOH/H2O 50:50 IV	2.736	0.976
EtOH/H2O 80:20 V	7.251	1.661
Sistema control	Media	Desviación estándar
metanol/agua 80:20	3.931	0.480

En el caso del acido C con el sistema V se obtuvo un buen resultado comparado con el control, el único inconveniente es que tiene una desviación estándar mayor a uno por lo que su variabilidad es mayor que la del control, que es menor a 0.5, aunque tomando en cuenta esta desviación los valores siguen siendo mayores que la del control. Contrario de lo que sucede con el sistema I que aunque supera la cantidad de antocianina extraída

tiene una variabilidad muy grande al tener una desviación estándar mayor a 3, lo que representa poca reproducibilidad en el extracto total, que se pudo deber a las interacciones de copigmentación y complejación que se pudieron presentar con este ácido y el disolvente

Tabla 16 Antocianina total con ácido D

Sistema ácido D	Media(mg/100 g harina)	Desviación estándar
Metanol I	2.522	0.119
Etanol II	0.833	0.520
Agua III	1.563	1.150
EtOH/H ₂ O 50:50 IV	2.045	1.866
EtOH/H ₂ O 80:20 V	2.661	0.900
Sistema control	Media	Desviación estándar
metanol/agua 80:20	3.931	0.480

En el caso del ácido D podemos ver que la cantidad de antocianina total extraída no logra superar al control en ninguno de los casos.

Otro dato notable es que para los sistemas donde solo se empleo agua para las extracciones, en todos los casos se encontró la misma complicación al realizar la purificación tres o hasta cuatro veces en esta parte del proceso.

Haciendo la comparación con algunos reportes como el de Ruiz torres et al.2008 donde de un total de 38 muestras de maíces coloridos obtuvo en promedio 4 mg/kg de harina, mientras que Lopez-Garcia (2009) reportan hasta un total de 2050 mg/100g de antocianina en harinas de maíces de color y Cortez et al (2006) reportan un contenido de antocianina total de 27.17 mg/ de harina de maíz azul.

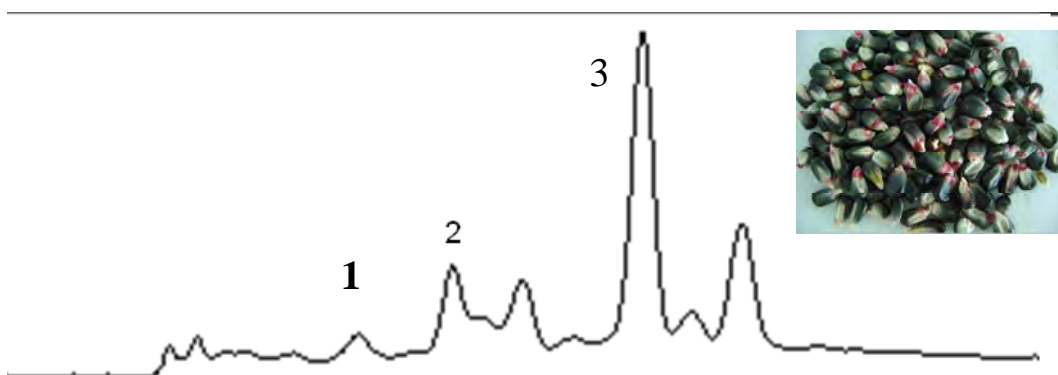
Los resultados obtenidos de los estudios citados presentan diferencias metodológicas tales como el tiempo de extracción de 24 hrs mientras que las extracciones que se realizaron en esta parte del estudio fueron de 12 hrs, además otra variable es la separación de componentes de menor polaridad con extracciones líquido-líquido que no se mencionan en los trabajos citados anteriormente ya que algunos flavonoides participan en el efecto batocrómico por copigmentaciones intermoleculares las cuales son interacciones hidrofóbicas que pueden estar sucediendo en el medio ya que el método se realiza en un medio acuoso, por lo que la remoción de algunos de estos que son de baja polaridad y por lo tanto son removibles con el acetato de etilo pueden estar afectando los resultados, además de la buena o mala homogenización de las muestras, estos factores

podieron haber contribuido a la diferencia de los valores entre este estudio y los mencionados ya que algunos valores o son muy altos o son muy bajos.

4.4 Cuantificación por HPLC

Para la cuantificación se realizaron 2 curvas patrón con estándares comerciales (vease *anexo I*)

A continuación se presentan los cromatogramas de cada uno de los maíces y la concentración de las antocianinas estudiadas.

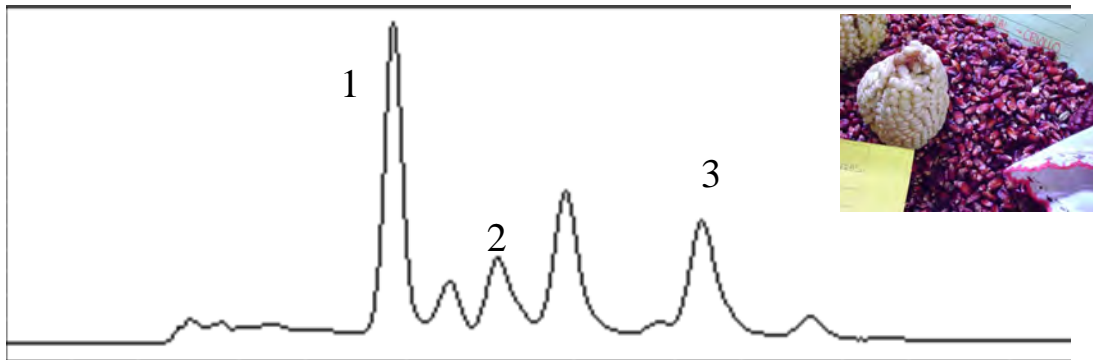


(1) pelargonidina-3-glucósido (2) cianidina-3-glucósido (3) probable peonidina-3-glucósido

Maíz	mg pelargonidina /100 g harina	mg de cianidina / 100 g harina
azul punta roja	0.78	3.36

Figura 33 Cromatograma y concentración de antocianinas en el maíz azul de punta roja

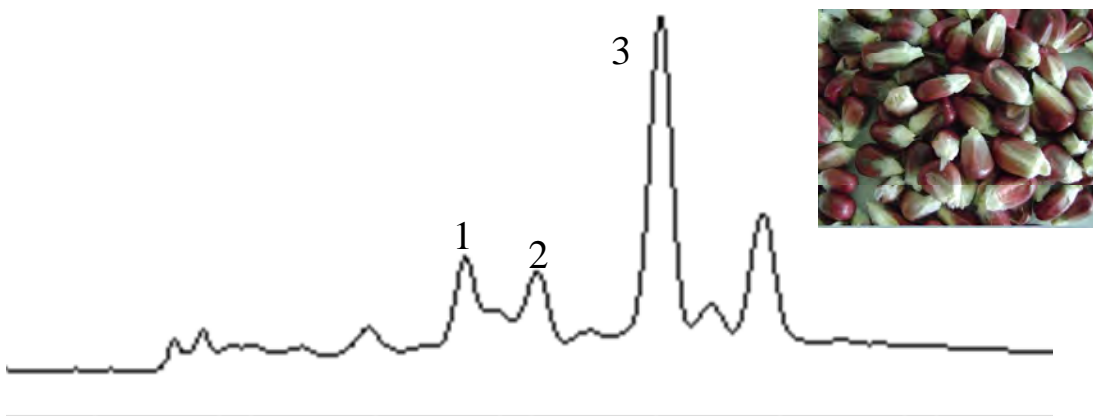
Al hacer una comparación con lo publicado por Fossen (2001) en el caso de estos maíces se pueden identificar las antocianinas por el orden de elución: pelargonidina-3-glucósido cianidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido (no cuantificada), la presencia de esta ultima se asume por los estudios de Escribano (2004) de maíces coloridos, además de los colores que puede presentar ésta antocianina, (azul morados tenues) ya que como se menciono previamente la coloración de las antocianinas cambia conforme cambia el patrón de sustitución en el anillo B y solo se ha reportado la presencia de la antocianina malvinidina que por su sustitución presenta coloraciones azul-moradas intensas o alguno de sus derivados, en muy baja concentración en maíz de acuerdo con lo publicado por Salinas-Moreno (2003) lo que hace mas probable la presencia de la antocianina peonidina-3-glucósido, pero debido a que no se pudo contar con un estándar de esta antocianina no se pudo verificar con absoluta certeza.



(1) pelargonidina-3-glucósido (2) cianidina-3-glucósido (3) probable peonidina-3-glucósido

Maíz	mg pelargonidina /100 g harina	mg de cianidina / 100 g harina
violeta	1.48	4.23

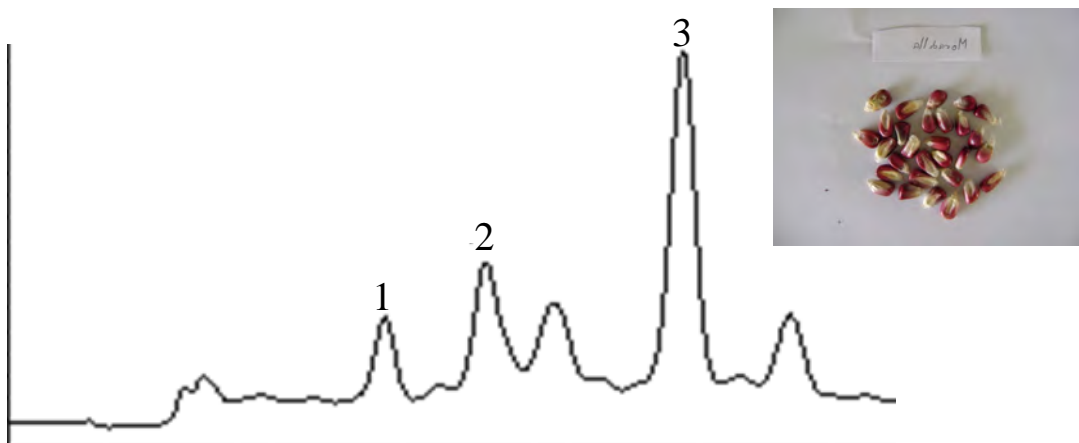
Figura 34 Cromatograma y concentración de antocianinas en el maíz Violeta



(1) pelargonidina-3-glucósido (2) cianidina-3-glucósido (3) probable peonidina-3-glucósido

Maíz	mg pelargonidina /100 g harina	mg de cianidina / 100 g harina
tlaxonole	0.23	6.11

Figura 35 Cromatograma y concentración de antocianinas en el maíz Tlaxonole



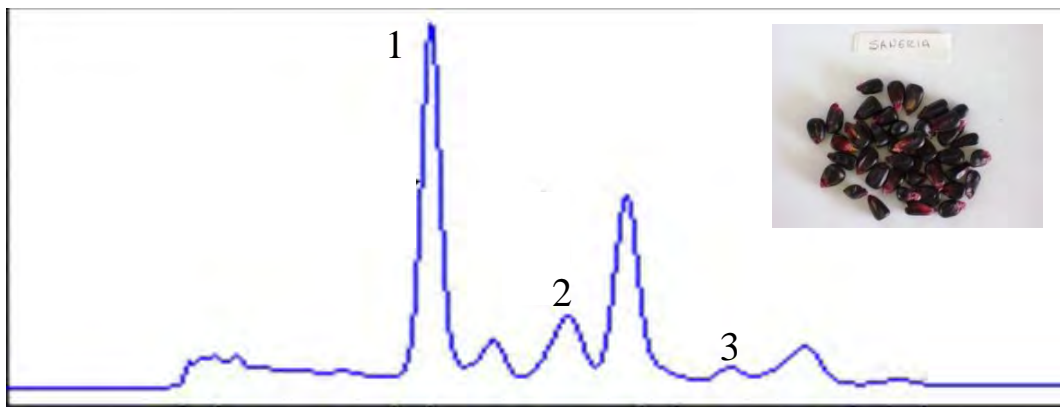
(1) pelargonidina-3-glucósido (2) cianidina-3-glucósido (3) probable peonidina-3-glucósido

Maíz	mg pelargonidina /100 g harina	mg de cianidina / 100 g harina
moradilla	0.36	1.03

Figura 36 Cromatograma y concentración de antocianinas en el maíz Moradilla

Como se observa en los cromatogramas las antocianinas tienen R_f muy cercanos entre las antocianinas aciladas y las no aciladas (lo que hace difícil su separación por otros métodos cromatográficos), que por lo general eluye la antocianina sin acilar seguida de sus derivados monoaciladas con ácido malónico (copigmentación intramolecular) por lo general en la posición 6 del azúcar y estas a su vez seguidas por las diaciladas también con ácido malónico tanto en las posiciones 3 y 6 del azúcar de acuerdo a los reportes de Salinas Moreno (2005) y Fossen (2001). Este patrón se puede observar en las figuras de la 33 al 36 de los diferentes maíces, por los picos que aparecen inmediatamente a las antocianinas de las cuales se tenían estándares comerciales, siendo el maíz violeta y el moradilla los que tuvieron la mayor presencia de la probable cianidina acetilada la cual es de importancia aplicativa debido a las coloraciones rojas que presenta.

La antocianina que se observa en mayor cantidad de las dos en estudio fue la cianidina-3-glucósido como se reportan en el estudio antes mencionado así como también lo reporta Escribano (2004) donde obtiene una abundancia relativa de 54%, Aoki 2002 donde se reportó como abundancia relativa de 73,3 % de sus derivados, seguida de los derivados de peonidina y en tercer lugar los de pelargonidina. Esta tendencia se puede observar en los valores de la concentración en cada una de estos maíces. La pelargonidina-3-glucósido al ser la antocianina con menos estabilidad pudo haberse destruido durante el proceso de obtención de los extractos por lo que observamos valores muy pequeños de concentración de esta antocianina.

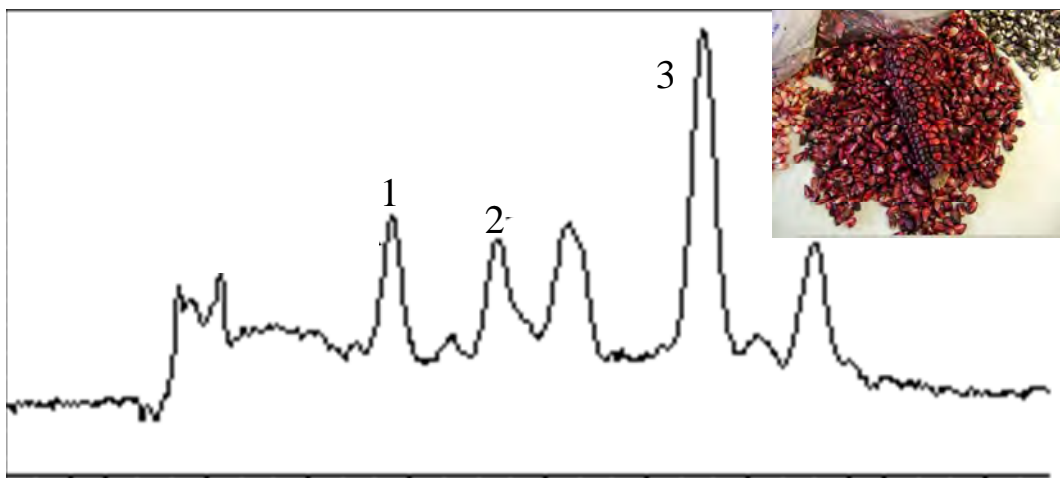


(1) pelargonidina-3-glucósido (2) cianidina-3-glucósido (3) probable peonidina-3-glucósido

Maíz	mg pelargonidina /100 g harina	mg de cianidina / 100 g harina
Negro	2.70	98.51

Figura 37 Cromatograma y concentración de antocianinas en el maíz Negro

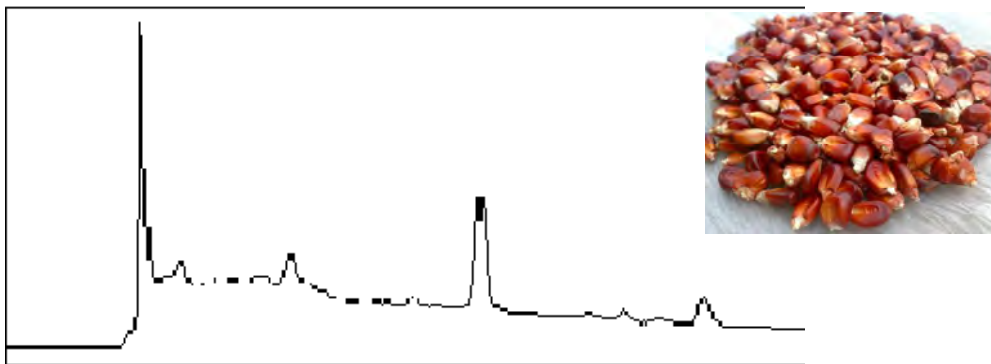
En el caso del maíz negro (figura 37) se muestra una mayor cantidad de las antocianinas cianidina-3-glucósido y pelargonidina-3-glucósido comparado con los otros maíces y por la cercanía del pico casi inmediato de la cianidina-3-glucósido, siendo otra característica notable la poca concentración de peonidina-3-glucósido.



(1) pelargonidina-3-glucósido (2) cianidina-3-glucósido (3) probable peonidina-3-glucósido

Maíz	mg pelargonidina /100 g harina	mg de cianidina / 100 g harina
rojo matizado	0.10	0.24

Figura 38 Cromatograma y concentración de antocianinas en el maíz Rojo Matizado



Maíz	mg. pelargonidina /100 g harina	mg. de cianidina / 100 g harina
coral	0	0

Figura 39 Cromatograma y concentración de antocianinas en el maíz coral

En el caso de el maíz rojo matizado se puede observar que la cantidad de antocianinas se encuentra a nivel de trazas (figura 38), donde se observa una mínima concentración de las antocianinas estudiadas, lo que sugiere que el color de este maíz puede estar proporcionado en conjunto por copigmentación con otro tipo de moléculas coloridas, como los flavonoides observando también el caso del maíz coral donde a pesar de tener una coloración roja sobre el pericarpio no contiene antocianinas, dado que las señales que se observa son en el nivel de ruido del equipo y no tienen ninguna correspondencia con los R_f de las antocianinas que se observa en los demás maíces. Y en el caso del maíz coral (figura 39) no se observa la presencia de antocianinas. Esto puede ser debido a la presencia de carotenoides, ya que estos también pueden presentar coloraciones rojizas, por lo que podrían estar presentes en maíz de acuerdo a lo publicado por Rodríguez. (1999) y Espinoza (2006), además tomando en cuenta la presencia de otro tipo de flavonoides presentes en maíz, ya que el método utilizado para la cuantificación por HPLC es específico para antocianinas.

Tabla 17 Concentración de pelargonidina-3-glucósido y cianidina-3-glucósido de los maíces estudiados.

Maíz	mg pelargonidina /100 g harina	mg de cianidina / 100 g harina
azul punta roja	0.78	3.36
violeta	1.48	4.23
tlaxonole	0.23	6.11
moradilla	0.36	1.03
negro	2.7	98.51
rojo matizado	0.1	0.24
coral	0	0

La baja cantidad de la antocianina pelargonidina-3-glucósido puede deberse a que el proceso de extracción no se llevo a cabo en obscuridad, ni en ausencia de oxígeno lo cual pudo haber destruido la antocianina, ya que como se ha mencionado en los capítulos anteriores, estos dos factores pudieron haber destruido a esta antocianina, ya que al ser la antocianina más sencilla de todas, su estabilidad es menor comparada con la de la cianidina-3-glucósido. Como se observa en la tabla 17 la antocianina más abundante de las dos antocianinas en estudio fue la cianidina-3-glucósido, siendo el maíz negro el que tuvo la mayor concentración de esta, por lo que este maíz puede significar una fuente importante de esta antocianina. Como lo describe Salinas (2005) solo se necesita un mg de antocianina para colorear 100g de yogurt de manera parecida a la de los colorantes sintéticos, así como una mezcla de estos extractos puede mejorar aún más la coloración de productos de pH medio como el yogurt. Por lo cual además de su poder de coloración estas moléculas tienen el valor de actuar como antioxidantes.

Capítulo 5 Conclusiones

De acuerdo con los objetivos planteados, se obtuvo una selección de maíces criollos coloridos, de la localidad de Ixtenco, Edo. de Tlaxcala, México. Dicha selección cumplía con las características necesarias que se buscaban para llevar a cabo este análisis.

Se desarrolló un sistema de elución para cromatografía en capa fina no reportado en la literatura que permite observar la complejidad del perfil de antocianinas de una manera cualitativa. Así mismo sienta la base para un sistema de elución que permitirá en el futuro la obtención de antocianinas que no sea a través de cromatografía de líquidos de alta resolución de forma preparativa.

Utilizando el sistema de elución desarrollado (sistema 321) se pudieron comparar los diferentes maíces criollos coloridos con otras fuentes naturales que contienen las antocianinas pelargonidina-3-glucósido y cianidina-3-glucósido, para su identificación cualitativa.

Se obtuvo un sistema de extracción EtOH/H₂O 80:20 V con ácido C que proporcionó mayor cantidad de antocianina extraída en comparación con el control.

Se obtuvo la cuantificación de las antocianinas pelargonidina-3-glucósido y cianidina-3-glucósido bajo las condiciones descritas para los diferentes maíces criollos coloridos que se seleccionaron para esta investigación, también se observa la presencia de otra antocianina que probablemente sea la peonidina-3-glucósido de manera importante en la mayoría de los maíces.

La hipótesis planteada se rechaza debido a que dos variedades de las siete estudiadas presentaron baja o nula presencia de antocianinas, que fueron las variedades maíz rojo matizado y maíz coral.

Finalmente el maíz negro es el maíz con la mayor cantidad de ambas antocianinas lo que lo convierte en una fuente no solo de productos de la molienda sino de colorantes con capacidad antioxidante.

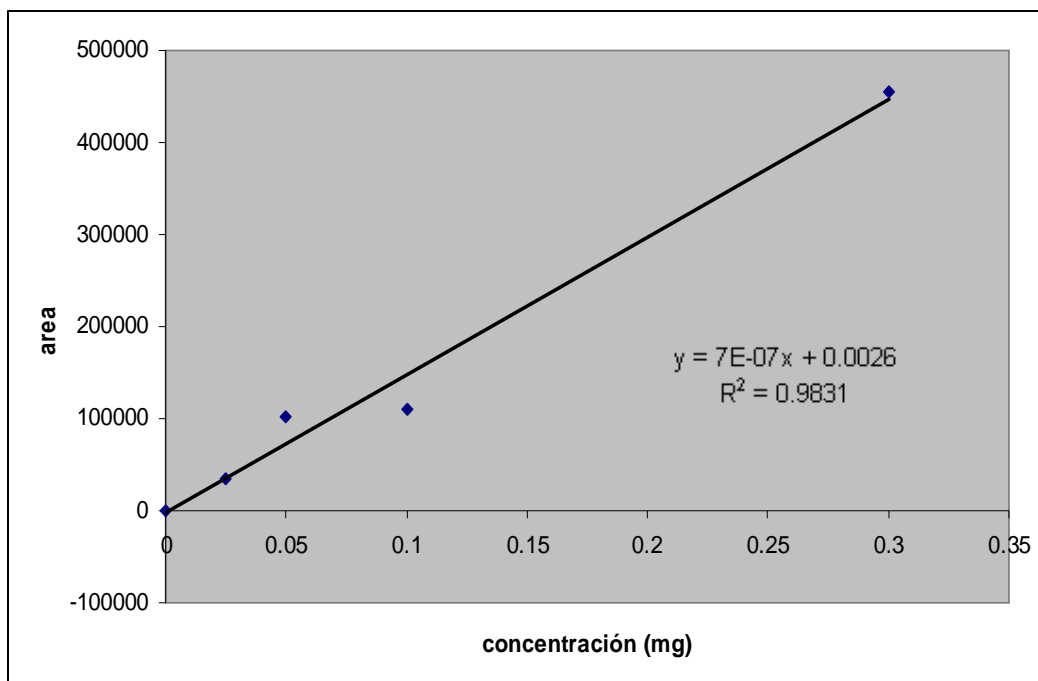
Capítulo 6 Recomendaciones

Por su consumo, las moléculas de antocianinas brindan beneficios al ser humano pero debido a que son susceptibles a destruirse o perder coloración por factores como el pH elevado, la temperatura la luz etc. su aplicación se ve limitada. Debido a esto se recomienda continuar con el estudio en la modificación de las moléculas, ya sea de una manera química o enzimática en diferentes partes de los anillos y glicósidos que las conforman ya que ha quedado demostrado que estas modificaciones aumentan su estabilidad en las condiciones que normalmente resultarían adversas y aumentaría su aplicación en el campo del desarrollo de productos alimenticios.

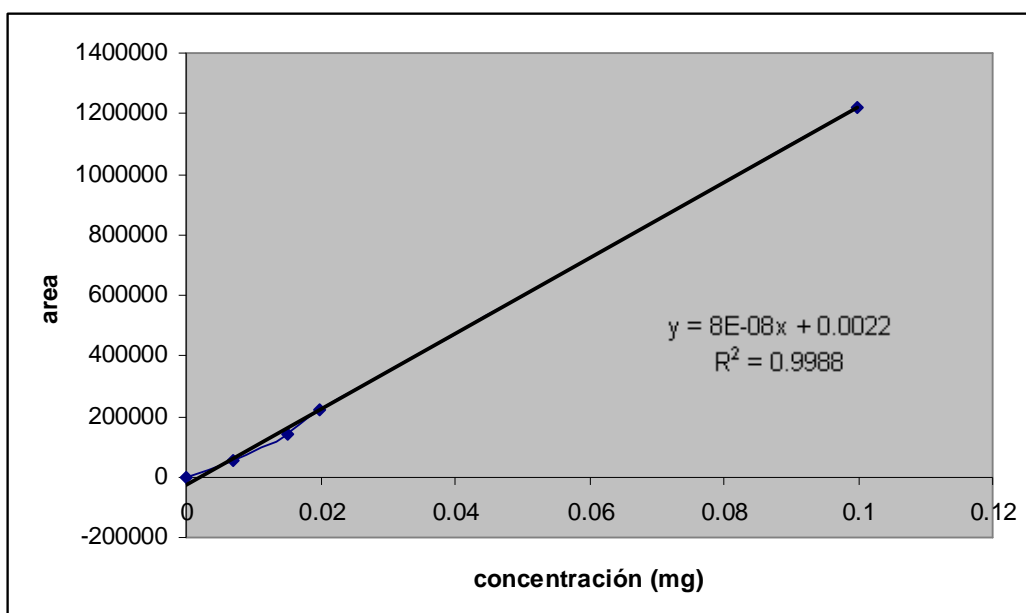
Apéndice I

Apéndice A Curvas patrón para la cuantificación por HPLC

Curva patrón de Cianidina-3-glucósido (Sigma-Aldrich) promedio de 3 repeticiones



Curva patrón de Pelargonidina-3-glucósido (Sigma-Aldrich) promedio de 3 repeticiones



Bibliografía

Aoki H, Kuze N, Kato Y *Anthocyanins isolated from purple corn (Zea mays L.)* San-Ei Gen F. F. I. Inc. The Japan Food Chemical Research Foundation FFI Journal No.199

Acevedo A. E. *et. al. Efecto de la nixtamalización sobre las características moleculares del almidón de variedades pigmentadas de maíz*. Interciencia 29-11 2004.

Bechtold T Mussak R. *Handbook of Natural Colorants* John Wiley & Sons, Ltd. 2009 p.p. (135-147,221-253)

Bennetzen J L. Hake S. *Handbook of Maize: Its Biology* Springer Science+Business Media, LLC 2009 p.p 13-41

Branen A. Larry Davidson P. Michael, Salminen Seppo. Thorngate III John H *Food Additives Second Edition Revised and Expanded* Marcel Dekker, Inc. New York • Basel 2002 p.p. 501-523.

Cárdenas E, Urtecho M Alvarado, K *Evaluación de la estabilidad de colorantes extraídos del maíz morado (Zea mays) para la elaboración de bebidas hidratantes* Trabajo de Graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero(a) Agrónomo(a) con el grado de Licenciatura Guácimo, Universidad Earth Costa Rica Diciembre, 2004

Chattopadhyay P, Sandipan C. y Sukanta K. Sen *Review Biotechnological potential of natural food grade biocolorants* African Journal of Biotechnology Vol. 7 (17), pp. 2972-2985 (2008).

Clifford M. N. *Anthocyanins – Nature, occurrence and dietary burden*. In: Journal of the Science of Food and Agriculture. Bd. 80, Nr. 7, S. 1063–1072 (2000).

Conca Armando. *Cereales y leguminosas* [Apuntes]. Distrito federal., México: Universidad Nacional Autónoma de México : Licenciatura en química de alimentos (2008).

Cortes G.A., M.Y. Salinas, E. San Martín-Martínez, F Martínez-Bustos *Stability of anthocyanins of blue maize (Zea mays L.) after nixtamalization of separated pericarp-germ tip cap and endosperm fractions*. Journal of Cereal Science 43 57–62 (2006).

Cuevas M. E., Antezana A. y Winterhalter P. *Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz (Zea mays) boliviano* memorias * red-alfa lagrotech * comunidad europea * (2008)

Delgado-Vargas F, Paredes-López O. *Natural colorants for food and nutraceutical use* CRC Press LLC USA 2003 p.p. (7-34,93-109,113-141,143-191,221-247)

Escribano-Bailon M.T., Celestino Santos-Buelga, J.C. Rivas *Review Anthocyanins in cereals*. Journal of Chromatography A, 1054 (2004) 129–141

Espinoza Trujillo Edgar, Mendoza Castillo Ma Del Carmen, Castillo Gonzalez Fernando *Diversidad Fenotípica Entre Poblaciones De Maíz Con Diferentes Grados De Pigmentación*. Revista fitotecnica mexicana año/vol 29, numero especial 2006

Estadísticas - Portal SAGARPA consultado 28 abril de 2009 página electrónica: <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Estadisticas/Paginas/default.aspx>

Fennema, Owen R. Food Chemistry Food Science and Technology Marcel Dekker, Inc. USA 1996 p.p.651-691.

Fossen Torgils,† Rune Slimestad,‡ and Øyvind M. Andersen*,† *Anthocyanins from Maize (Zea mays) and Reed Canarygrass (Phalaris arundinacea)* J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 2318-2321

Froehlicher Thomas, Hennebelle Thierry, Martin-Nizard Françoise, Cleenewerck Patricia, Hilbert Jean-Louis, Trotin Francis, Sébastien *Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts*. Food Chemistry Food Chemistry Vol. 115, Issue 3, Pages 897-903

Garzón Gloria Astrid, *Anthocyanins As Natural Colorants And Bioactive Compounds. A Review* Acta biol. Colomb. Vol. 13 No. 3, 27 – 36 (2008).

Gonzalez-Manzano Susana, Jose J. Perez-Alonso a, Yolanda Salinas-Moreno, Nuno Mateus , Artur M.S. Silva d, Victor de Freitas , Celestino Santos-Buelga *Flavanol–anthocyanin pigments in corn: NMR characterisation and presence in different purple corn varieties*. Journal of Food Composition and Analysis 21 (2008) 521– 526

Grotewold Erich *The Science of Flavonoids* Springer Science_Business Media, Inc. (2006) p.p. 215-229

Gorriti Gutierrez Arilmi et. al. *Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante de las corontas del maíz morado (Zea mays L.): Método de extracción*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8 (6), 509 – 518 (2009).

Gould Kevin · Davies Kevin · Winefield Chris (Eds.) *Anthocyanins Biosynthesis, Functions, and Applications* Springer Science+Business Media, LLC 2009 p.p. 1-16, 283-290.

Gutiérrez-Cortez E. I. Rojas-Molina; M. Cornejo-Villegas; M. E. Rodríguez, *Cambios morfológicos y estructurales en pericarpio de maíz y su influencia en la difusión de calcio durante el proceso de nixtamalización* consultado 10 abril 2009 pagina electrónica http://www.amemi.org/Docs/simposia_materiales/platicas_invitadas/ceram_biomat/CAMBOS_MORFOL%C3%93GICOS_Y_ESTRUCTURALES.pdf

Hoseney R. Carl Principios de Ciencia y Tecnología de los Cereales Ed. Acribia Zaragoza España 1996 p.p.10-19

Ixtenco H. Ayuntamiento: Cultura, Artesanías, costumbres consultado 2 abril de 2009 página electrónica: <http://www.ixtenco.gob.mx/>

Jiménez Carla Del Carpio, Carlos Serrano Flores , Mónica Giusti *Caracterización De Las Antocianinas De Los Frutos De Lechler Berberis boliviana* Rev Soc Quím Perú. 75 (1) 2009 de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v75n1/a10v75n1.pdf>

Kuskoski E. Marta; Agustín G. Asuero; M. Carmen García-Parilla; Ana M. Troncoso; Roseane Fett *Actividad antioxidante de pigmentos antocianínicos* Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.24 no.4 Campinas Oct./Dec. 2004

Kulp Karel, Ponte, Joseph G. Jr (Eds.) *Handbook of Cereal Science and Technology* 2ª edición 2000 Marcel Dekker, Inc p.p. 31-81

López Ramirez Rosalba, Winston Quiñones, Fernando Echeverri. *Perfil cromatográfico de las antocianinas presentes en algunos frutos colombianos* Scientia et Technica Año XIII, No 33.UTP. ISSN 0122-1701

MacDougall Douglas B. *Colour in food Improving quality*, Woodhead Publishing Limited 2002 p.p. (9-60)

MAÍZ-Etimologías consultado 9 agosto 2010 página electrónica: <http://etimologias.dechile.net/?mai.z>

Maíz: Principales enfermedades - Econoagro consultado 10 agosto 2009 página electrónica: <http://www.econoagro.com/verArticulo.php?contenidoID=153>

Matysik G. M. Benesz *Thin-layer chromatography and densitometry of anthocyanins in the petals of red poppy during development of the flowers* de <http://www.springerlink.com/content/pk51k0460840707v/>.

Muñoz Muñoz Isabel Margarita, Soto Rojas Víctor Emanuel (2005) *“Determinación de la capacidad protectora de antocianinas de un extracto de vitis vinifera en aortas de rata sometidas a estrés oxidativo”*. Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de licenciado en kinesiología facultad de medicina.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *El maíz en la nutrición humana* (Colección FAO: Alimentación y nutrición, N°25) Código FAO: 86 AGRIS: S01 ISBN 92-5-303013-5 Roma 1993.

Portal de Gobierno del Estado de Tlaxcala consultado 28 abril de 2009 página electrónica: <http://www.tlaxcala.gob.mx/historia/index.html>

Portal de Gobierno del Estado de Tlaxcala consultado 13 abril de 2009 página electrónica: <http://www.tlaxcala.gob.mx/geografia.html>

PROFITOCOOP 2008 *Betalaínas: colorantes naturales con actividad antioxidante*
consultado 28 mayo 2010 pagina electronica:
<http://profitocoop.com.ar/articulos/Betala%EDnas.pdf>

Salinas moreno et al. *Acido eleagico y perfil de antocianinas en frutos de frambuesa (Rubus idaeus L) con diferente grado de maduracion* de <http://www.buscagro.com/cgi-bin/mp/jump2.cgi?ID=51407>

Robutti José L. *Calidad y Usos del Maíz INTA Pergamino Gacetillas IDIA XXI 11-08-2004*

Rein Maarit *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins* tesis académica Facultad de Agricultura y Silvicultura de la Universidad de Helsinki. Departamento de Química Aplicada y la División de Microbiología Química de Alimentos. (2005).

Rodriguez-Amaya Delia B. *Latin american food sources of carotenoids* recuperado 3 junio de 2010 de http://www.nutricionemexico.org.mx/alan/1999_S1_12.pdf (1999)

Ruiz Torres Norma A.et.al. *Determinación De Compuestos Fenolicos Y Su Actividad Antioxidante En Granos De Maiz*. revista fitotecnica mexicana septiembre 31-3 2008.

Salinas Moreno, Yolanda, Rubio Hernandez, David Y Diaz Velazquez, Antonio. *Extracción y uso de pigmentos del grano de maíz (ZEA MAYS l.) como colorantes en yogur*". Archivos Latinoamericanos de nutrición, vol.55, no.3, p.293-298. (2005)

Schniidt-Hebbel Hermann. *Avances en Aditivos alimentarios y la reglamentación de los alimentos. Aplicaciones y comentarios de orden químico y tecnológico*. San Francisco 4.54 Santiago-Chile Editorial universitaria 1990 p.p. 68-72

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SIAP - Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. consultado 28 abril de 2009 página electrónica: <http://www.siap.gob.mx/>

Socaciu Carmen *Food colorants: chemical and functional properties*. Taylor & Francis Group, LLC (2008) p.p. (25-51, 87-101,197-227,429-553)

Tlaxcala - Explorando México consultado 2 abril de 2009 página electrónica: <http://www.explorandomexico.com.mx/map-gallery/0/53/>

Tlaxcala - Ixtenco - INAFED - E-Local consultado 2 abril de 2009 página electrónica: <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/tlaxcala/mpios/29016a.htm>

Zhang Y., X.S. Hu, F. Chen, J.H. Wu, X.J. Liao , Z.F. Wang *Stability and colour characteristics of PEF-treated cyanidin-3-glucoside during storage* Food Chemistry 106 (2008) 669–676.