



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EXTRACCIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE ANTOCIANINAS DEL SALVADO DE  
MAÍZ MORADO, CRIOLLO (Zea mays L.) PARA SU APLICACIÓN EN  
ALIMENTOS**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**ANABEL GASCA GALVEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Arturo Navarro Ocaña

**VOCAL:** Profesor: José Guillermo De Jesús Aguilar Osorio

**SECRETARIO:** Profesor: Bertha Julieta Sandoval Guillen

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Jorge Arturo Aburto Anell

**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

**Asesor del tema:** Dr. Arturo Navarro Ocaña\_\_\_\_\_

**Supervisor técnico:** Dra. Hilda Elizabeth Calderón Villagómez\_\_\_\_\_

**Sustentante:** Anabel Gasca Gálvez\_\_\_\_\_

INDICE	PAG
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	
1.1 El maíz	2
1.1.1 La planta de maíz	2
1.1.2 El origen del maíz	4
1.1.3 Producción y consumo Mundial y Nacional	5
1.1.4 Variedades de maíz	6
1.1.5 Estructura y composición del grano de maíz	8
1.1.6 Salvado	10
1.1.7 Compuestos bioactivos del salvado de maíz	10
1.1.7.1 Fibra dietética	10
1.1.7.2 Proteínas	11
1.1.7.3 Vitaminas	11
2.1.6.2 Minerales esenciales	12
2.1.6.3 Compuestos fenólicos	13
1.2 Antocianinas	14
1.2.1 Factores que afectan la estabilidad de antocianinas	15
1.2.1.1 Efecto del pH y luz	15
1.2.1.2 Efecto de temperatura	16
1.2.1.3 Efecto del oxígeno y ácido ascórbico	16
1.2.1.4 Efecto de la concentración de pigmentos y agua	17
1.2.1.5 Efecto de los metales	17
1.2.1.6 Efecto de las enzimas	17
1. 2.1.7 Copigmentación	17
1.3 Extracción de antocianinas	18
1.3.1 Disolventes de extracción y procesamiento	18
1.3.1.1 Agua	19
1.3.1.2 Metanol	19
1.3.1.3 Etanol	19
1.3.1.4 Isopropanol	20
1.3.1.5 Acetona	20
1.3.2 Ácidos orgánicos	21
1.3.2.1 Ácido acético	21
1.3.2.2 Ácido láctico	21
1.3.2.3 Ácido cítrico	22
1.3.2.4 Ácido tartárico	22
1.3.2.5 Ácido succínico	23
1.4 Colorantes	23
1.4.1 Encapsulación	23
1.4.2 Medición de color	24

JUSTIFICACIÓN	25
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS PARTICUALRES	26
HIPÓTESIS	26
2. METODOLOGÍA	
2.1 Diagrama general	27
2.2 Etapa I	28
2.2.1 Obtención de salvado	28
2.3 Etapa II	28
2.3.1 Acondicionamiento de muestras	29
2.3.2 Determinación de tiempo	29
2.3.3 Determinación de relación muestra- disolvente	29
2.3.4 Extracción simple y múltiple	29
2.3.5 Extracciones con disolventes a diferentes Concentraciones	30
2.3.6 Extracciones con diferentes ácidos orgánicos	30
2.3.7 Antocianinas totales por pH diferencial	30
2.3.8 Cuantificación de antocianinas por HPLC	31
2.3.9 Polifenoles totales	31
2.3.10 Análisis estadístico	31
2.4 Etapa III	32
2.4.1 Escala preparativa	32
2.4.2 Preparación de colorantes	32
2.4.3 Medición de color	33
2.5 Etapa IV	33
2.5.1 Bebidas	33
2.5.2 Yogurt	34
2.5.3 Tortillas	34
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Etapa I	35
3.1.1 Obtención de salvado	35
3.2 Etapa II	36
3.2.1 Determinación de tiempo	36
3.2.2 Relación muestra-disolvente	37
3.2.3 Extracción simple y múltiple	38
3.2.4 Extracciones con disolventes a diferentes concentraciones	40
3.2.5 Extracciones con diferentes ácidos orgánicos	42
3.2.6 Cuantificación y comparación de Antocianinas por métodos de pH diferencial y HPLC	45
3.2.7 Cuantificación de polifenoles totales y relación con las antocianinas totales	50

3.3 Etapa III	52
3.3.1 Rendimientos a escala preparativa	52
3.3.2 Medición de color a colorantes en polvo y líquido	53
3.4 Etapa IV	55
3.4.1 Bebidas	55
3.4.2 Yogurt	59
3.4.3 Tortillas	61
4. CONCLUSIONES	63
5. RECOMENDACIONES	64
6. BIBLIOGRAFÍA	65

## INTRODUCCIÓN

El maíz es una especie nativa de México, pertenece a la familia *Poacea*, la que incluye a otros importantes cereales como el trigo, la cebada, la avena, el centeno y el arroz. El maíz pertenece al género *Zea*, el cual comprende cinco especies que se sabe son originarias de México y Centroamérica: entre ellas es *Zea mays* L.

El maíz con las características que se conocen ahora es un producto de la evolución de la especie silvestre llamada teocintle, éste como otros cereales en el mundo, tenía características que la hacían atractiva para los grupos de cazadores-recolectores; por lo que surgió la domesticación y las modificaciones de la planta hasta lo que es hoy en día. En México y Centro América se consume principalmente en forma de productos como tortillas, tamales, y totopos.

Los maíces pigmentados contienen compuestos fenólicos, los cuales han despertado interés por sus propiedades antioxidantes y bioactivas, como ácido ferúlico, cumárico y sus derivados. También se ha encontrado que los extractos etanólicos de maíz morado y azul poseen actividades antimutagénicas, anticarcinogénicas y actividades contra los radicales libres; estas actividades fueron asociadas con las antocianinas localizadas tanto en el pericarpio, como en la capa de aleurona del maíz.

Las antocianinas son colorantes responsables por el color rojo, azul y morado de las flores, frutas o cereales que las contienen, el cual dependerá del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula.

Se han realizado trabajos previos en el cual se busca su extracción, purificación y uso como colorantes naturales para su aplicación en alimentos. Sin embargo, estas moléculas se caracterizan por ser inestables a la luz, temperatura, oxidación, pH, copigmentación entre otros factores ambientales.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 El Maíz

#### 1.1.1 La planta del maíz

Maíz es una palabra de origen caribeño que fue traída a México por los españoles. En náhuatl se le conocía como *tlaoilli*, palabra con la que también se designaba a los granos. Cuando la mazorca se encontraba muy tierna se le decía *xílotl*, cuando los granos ya se habían formado se le conocía como *élotl* y cuando ya estaba seca se le decía *centli*. Se trata de una planta anual, cuyo tallo puede alcanzar gran altura. Las partes que la conforman, (Figura 1) raíces primarias son robustas y cuenta con raíces adventicias que mantienen a la planta erecta. Tiene flores masculinas (espiga) y femeninas (mazorcas). En la mazorca se forman granos en hileras cuyo número depende de la raza y está encerrada en varias brácteas o vainas de las hojas (totomoxtle)

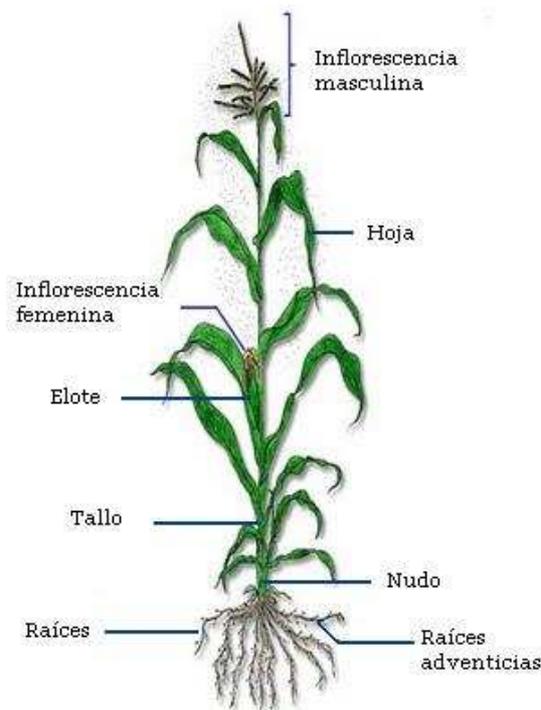


Figura 1. Planta del maíz. (Vela, 2011)

El maíz es una planta humana, cultural en el sentido profundo del término, porque no existe sin la intervención inteligente y oportuna de la mano; no es capaz de reproducirse por sí misma. Más que domesticada, la planta del maíz fue creada por el trabajo humano. (Vela, 2011)

Pertenece a la familia *Poaceae*, la que incluye otros importantes cereales como el trigo, la cebada, la avena, el centeno y el arroz. El maíz pertenece al género *Zea*, el cual comprende cinco especies que se sabe son originarias de México y Centroamérica: entre ellas el *Zea mays* L., que a su vez contiene cuatro subespecies: 1) *Zea mays* L. ssp. *Huehuetenangensis*, distribuida en los altos de Guatemala; 2) *Zea mays* L. ssp. *Mexicana*; 3) *Zea mays* L. ssp. *Parviglumin*, el teocintle y 4) *Zea mays* L. ssp. *Mays* a la que pertenece el maíz que se cultiva en México. (Vela, 2011)

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 (Tanaka y Yamaguchi, 1972).

La planta desarrolla características y diferencias morfológicas en las fases vegetativa y de reproducción como consecuencia, en el terreno 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.

La morfología o arquitectura de la planta también ha sido objeto de presiones de evolución 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. (Barber, 1979).

### *1.1.2 Origen del Maíz*

El cultivo del maíz tuvo su origen, en América Central, especialmente en México, de donde se difundió hacia el norte, en Canadá y hacia el sur hasta Argentina. La evidencia más antigua de la existencia del maíz 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. (FAO, 1993)

Al cultivar el maíz, el hombre también se cultivó. Las grandes civilizaciones del pasado y la vida misma de millones de mexicanos de hoy, tiene como raíz y fundamento al generoso maíz. Ha sido un eje fundamental para creatividad cultural de cientos de generaciones; exigió el desarrollo y el perfeccionamiento continuo de técnicas para cultivarlo, condujo al surgimiento de una cosmogonía y de creencias y prácticas religiosas que hacen del maíz una planta sagrada; permitió la elaboración de un arte culinario de sorprendente riqueza; marcó el sentido del tiempo y ordenó el espacio en función de sus propios ritmos y requerimientos; dio motivo para las más variadas formas de expresión estética; y se convirtió en la referencia necesaria para entender formas de organización social, maneras de pensamiento y conocimiento y estilos de vida de las más amplias capas populares de México. Por eso, es verdad, el maíz es el fundamento de la cultura popular mexicana. (Bonfil, 2007)

Aun con los profundos cambios que trajo consigo la conquista española, el maíz permaneció siendo la planta preferida de los mexicanos, se adoptaron los ingredientes de otras tierras y se asimilaron a la tradición culinaria que hundía sus raíces en la época prehispánica. Se paso de tamales rellenos de frijoles, pepitas, o carne de ave envueltos en el totemoxtle, a los que encierran guisos con carne de puerco envueltos en hoja de plátano. La tortilla es una maravilla de ingeniería culinaria, ahora recibe no sólo nopales, quelites, frijoles o salsa, sino también toda la variedad de guisos.

Sin embargo el maíz enfrenta riesgos cada vez más graves. Su creciente uso para fines distintos a la alimentación, por ejemplo la producción de etanol y una tendencia al uso preferente de ciertas variedades (principalmente blanco y amarillo) pone en riesgo la sobrevivencia de la amplia variedad de las razas presentes en las distintas regiones de la República, a los que no se les toma en cuenta por su tamaño, características del grano y por su color.

El teocintle es la especie silvestre más cercana biológicamente al maíz, y por ello ha sido considerado como el ancestro a partir del cual se dio el proceso que condujo a la domesticación de esa planta. Se encuentra no sólo su estructura genética, sino ciertos rasgos que permiten suponer que atrajo la atención de los grupos que tenían la recolección como una de sus principales actividades de subsistencia. Es una planta que se da con cierta abundancia y semillas de buen tamaño. Si se compara con el maíz se encuentra que es bastante menos productivo y su recolección más complicada, no hay que olvidar que las ventajas de aquél, son producto de la manipulación selectiva a lo largo de miles de años. En su momento el teocintle debió ofrecer suficientes ventajas a los grupos humanos como para que reiteradamente lo buscaran para obtener alimento. (Vela, 2011)

### *1.1.3 Producción y consumo Mundial y Nacional*

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) estima que la producción mundial de maíz 2011/12 será de 868,06 millones de toneladas, cerca de 500.000 toneladas superior a lo estimado el mes pasado y continúa siendo más de 40 millones de toneladas superior a lo cosechado en la campaña 2010/11.

Tabla 1. Principales países productores mundiales del maíz

País	Millones de toneladas	País	Millones de toneladas
Estados Unidos	313,91	Canadá	10,7
China	191,75	Nigeria	8,7
Unión Europea	64,31	Indonesia	8,1
Brasil	61,0	Filipinas	7,0
Argentina	26,0	Rusia	6,68
Ucrania	22,5	Serbia	6,26
India	21,0	Vietnam	5,4
México	20,5	Otros países	81,73
Sudáfrica	12,5		

(Agropanorama, 2012)

En México se destina al maíz la mitad de la superficie cultivada (7.4 millones de hectáreas); casi tres millones de personas trabajan en su cultivo (8% de la fuerza laboral) y se produce anualmente cerca de 18 millones de toneladas, desafortunadamente insuficientes para cubrir nuestras necesidades, por lo que México, cuna de la plana se ve obligado a importar el grano. (Vela, 2011)

De acuerdo a la información Agroalimentaria indican que el 67% de la producción de maíz de todo el ciclo agrícola de 2010 se concentró en 7 estados de la República, donde destaca el estado de Sinaloa, que produjo el 28.33 por ciento del total nacional, seguido por Jalisco con el 11.5, México 5.8, Michoacán 5.4, Chihuahua 5.4, Guanajuato 5.3 y Guerrero con el 5.2 por ciento. (CEFP, 2011)

#### 1.1.4 Variedades de maíz

El cultivo de maíz en México se caracteriza por la producción de una amplia gama de variedades, por lo que es posible generar una gran cantidad de productos finales: tortillas, forraje para animales, almidones, glucosa, fructosa, aceites, botanas, etanol para bebidas o como insumo en la producción de biocombustibles, etc. En la tabla 2 se muestran las diferentes variedades de maíz en México.

Tabla 2. Variedades de maíz en México y sus principales usos

Variedad	Uso
Maíz cerero o ceroso	Se utiliza en la elaboración de adhesivos y gomas
Maíz cristalino	Como alimento
Maíz dulce	Como alimento para enlatados
Maíz dentado	Como alimento en la industria
Maíz palomero	Como alimento
Maíz semidentado	Como alimento para mejoramiento genético
Maíz truncado	Como mejoramiento genético del maíz en general
<b>Maíz azul y morado</b>	<b>Como alimentos típicos y botanas</b>

(CIMMYT, 2009)

Por lo general, se hace mención principalmente de dos variedades de maíz, blanco, amarillo o forraje. El maíz blanco se usa exclusivamente para consumo humano, en virtud de su alto contenido nutricional, en tanto que el maíz amarillo se destina al procesamiento industrial y a la alimentación animal.

El maíz morado ha sido cultivado en América latina, principalmente en Perú, los peruanos lo han usado como alimentos por varios siglos; como la chicha morada, que es una bebida típica de allá.

El extracto del maíz morado es rico en antocianinas y bioactivos fenólicos, el colorante de antocianinas está aprobado en Japón y en la lista "Existing Food Additive List" El color del maíz morado ha sido usado como colorante para bebidas, jaleas, dulces, etc.

Recientemente se ha reportado que las antocianinas tienen varias actividades biológicas, tal como antioxidante, antimutagénica, antidiabético y actividades anticancerígenas. Especialmente se ha reportado disminución de carcinogénesis en colon de rata, inducido por PhIP (2 -amino-1 metil-6-fenilimidazo-{4,5-b}-piridina). En esta forma las antocianinas no sólo han sido un colorante para alimentos sino también como un material alimenticio de salud. (Hiromitsu Aoki, 2002).

### *1.1.5 Estructura y composición 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 1000 granos según el número de hileras y el diámetro y longitud de la mazorca.

El grano de maíz se denomina en botánica carióspside o cariopsis; cada grano contiene el revestimiento de la semilla, o cubierta seminal, y la semilla, como se ve en la Figura 2 también se muestra las cuatro estructuras físicas fundamentales del grano: el pericarpio, cáscara o salvado; el endospermo, el germen o embrión; y la piloriza (tejido inerte en que se unen el grano y el carozo).

En la figura 3 se muestra la composición porcentual, donde la cubierta seminal o pericarpio se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87 por ciento, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa 67%, celulosa 23% y lignina 0.1%. El endospermo, en cambio, contiene un nivel elevado de almidón 87%, aproximadamente 8% de proteínas y un contenido de grasas crudas relativamente bajo. El germen se caracteriza por un elevado contenido de grasas crudas, 33% por término medio, contiene también un nivel relativamente elevado de proteínas próximo al 20% y minerales. Se dispone de algunos datos sobre la composición química de la capa de aleurona, elemento con un contenido relativamente elevado de proteínas aproximadamente el 19% de fibra cruda.

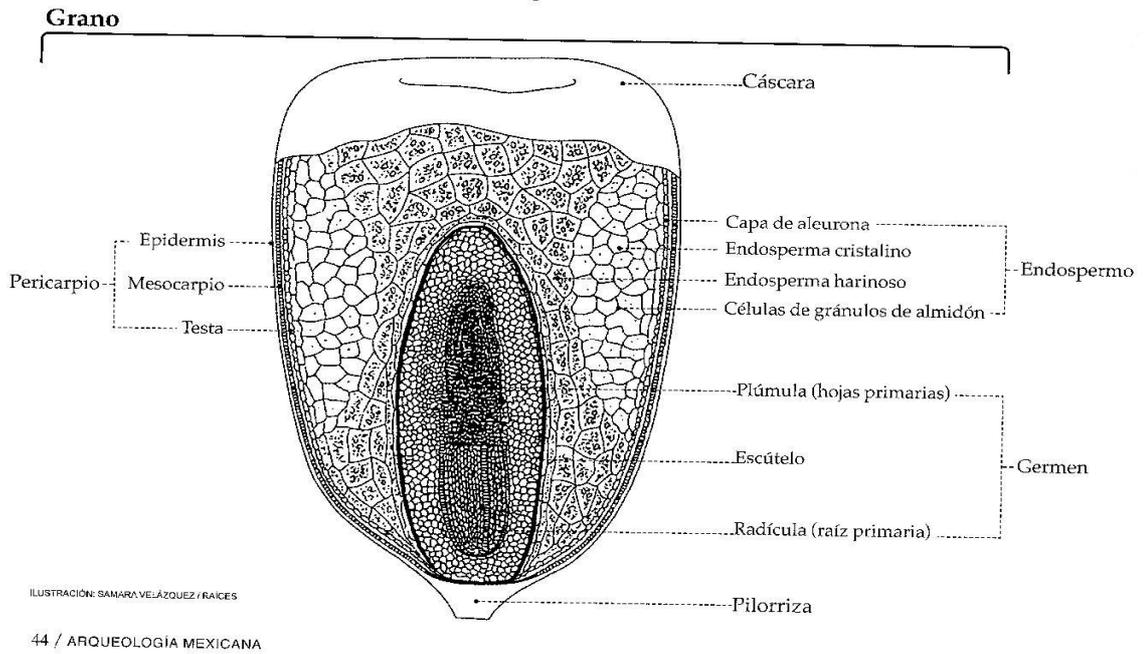


Figura 2. Estructura del grano de maíz. (Vela, 2011)

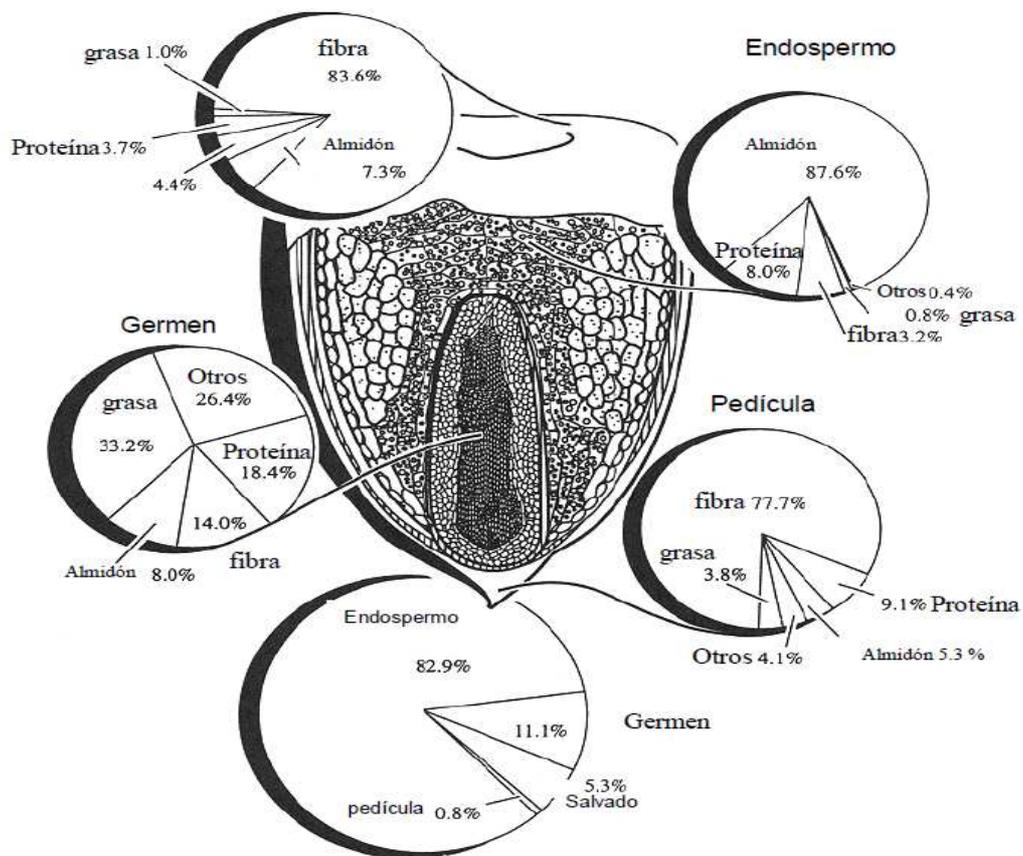


Figura 3. Composición del grano de maíz y las partes anatómicas. (Kulp, 2000)

Tabla 3. Distribución ponderal de las principales partes del grano

Estructura	% de distribución ponderal
Pericarpio	5-6
Aleurona	2-3
Endospermo	80-85
Germen	10-12

La distribución ponderal de las distintas partes del grano se indica en el Tabla 3. Al endospermo, la parte de mayor tamaño, corresponde cerca del 83% del peso del grano, en tanto que el germen equivale por término medio al 11% y el pericarpio al 5%. El resto está constituido por la piloriza, estructura cónica que junto con el pedicelo une el grano a la espiga. (FAO, 1993)

#### 1.1.6 *Salvado*

Subproducto obtenido del procesamiento de cereales por vía seca, luego de tamizar la harina producto de la molienda. El salvado corresponde a las capas externas del grano y más concretamente al pericarpio, con sus tres subcapas: epicarpio, metacarpio y endocarpio (ricas en fibras y minerales), la testa (rica en vitaminas y enzimas) y la capa de aleurona (rica en proteínas y grasas). (Botanical, 1999)

#### 1.1.7 *Compuestos bioactivos del salvado de maíz*

##### 1.1.7.1 *Fibra dietética*

La fibra dietética es el componente químico que se halla en cantidades mayores en el salvado. Los hidratos de carbono complejos del grano de maíz se encuentran en el pericarpio y la piloriza, aunque también en las paredes celulares del endospermo y, en menor medida, en las del germen.

Sandstead et al, 1978 hallaron que el salvado de maíz está formado por un 75 por ciento de hemicelulosa, un 25 por ciento de celulosa y 0,1 por ciento de lignina, en peso en seco.

### 1.1.7.2. Proteínas

En las variedades comunes, el contenido de proteínas puede oscilar entre el 8 y el 11 por ciento del peso del grano, y en su mayor parte se encuentran en el endospermo y encontrando un 3.5 por ciento aproximadamente en el salvado siendo el de maíz el más bajo en comparación con el salvado de arroz y avena.

### 1.1.7.3. Vitaminas

El contenido vitamínico del maíz, al igual que el de los demás alimentos y nutrientes, depende de factores intrínsecos (especie y variedad) y extrínsecos (tipo de suelos y procesado de la materia prima). Por ello, las cifras de contenido vitamínico pueden presentar importantes diferencias según el país de origen y la zona, aun en el mismo país.

Las vitaminas hidrosolubles se encuentran fundamentalmente en la capa de aleurona y en menor medida en el germen y en el endospermo.

El salvado es rico en vitaminas del grupo B y su importancia radica en la transformación de grasas, proteínas e hidratos de carbono en energía vital. Tiene gran importancia en la salud del sistema nervioso y en la producción de hormonas y enzimas, así como el fortalecimiento del sistema inmunológico.

Vitamina B1: tiamina o aneurina, sustancia capaz de prevenir o curar los síntomas clínicos conocidos bajo el nombre de "beri-beri", el contenido promedio de B1 en el maíz entero es importante, representando alrededor de 1,1 mg/1000 Kcal. La tiamina es relativamente estable al calor seco pero se destruye rápidamente en soluciones neutras o alcalinas, y es sensible a la oxidación, por lo cual se pierde en el proceso de nixtamalización del maíz.

Vitamina B2: riboflavina, lactoflavina u ovoflavina, constituye el factor termoestable del complejo B, se encuentra en el organismo bajo las formas activas de flavin-mono-nucleótido (FMN) y flavin-adenina-dinucleótido (FAD), grupos prostéticos de flavoproteínas que intervienen en diversas reacciones de oxido-reducción relacionadas con el metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas y lípidos. El contenido promedio de B2 en el maíz entero también es importante, representando 0,6 mg/1000 Kcal.

Niacina: nicotinamida o vitamina PP (preventiva de la pelagra), es sumamente estable al calor, tanto seco como en solución, pero en el maíz se encuentra en su mayor parte "no biodisponible" formando los compuestos niacitina y niacinógeno, de los que no es liberada durante la digestión en el intestino. Por ello, cuando el maíz fue introducido en el norte de España y de Italia y se lo trató para panificación, como se acostumbraba hacer con el trigo, surgió en las poblaciones pobres la enfermedad carencial pellagra, que llevó al descubrimiento de esta vitamina. Sin embargo en América, de modo intuitivo, el maíz era molido y tratado durante toda la noche con agua de cal. Este proceso recibió el nombre de "nixtamalización". Mediante este tratamiento se libera la niacina de los compuestos niacitina y niacinógeno, y puede ser absorbida en el intestino. El contenido de niacina en el maíz antes y después de la nixtamalización es, respectivamente, de 0,04 y 2,6 mg/100 g, que representan 3,2 y 10,0 equivalentes de niacina por 1000 Kcal.

Acido fólico: las funciones del ácido fólico están relacionadas con el transporte y transferencia de grupos de un carbono (metilo, formilo, metenilo, metileno o formilino), necesarias para la biosíntesis de purinas y de timina, lo cual explica su papel fundamental en el crecimiento y reproducción celular y en la hematopoyesis. Su deficiencia produce anemia megaloblástica. El contenido en el maíz es considerable pero se debe tener en cuenta que se destruye fácilmente por calentamiento. (FAO, 1993)

#### 1.1.7.4. *Minerales esenciales*

La concentración de cenizas en el grano de maíz es aproximadamente del 1,3 por ciento. Los factores ambientales influyen probablemente en dicho contenido. El germen es relativamente rico en minerales, con un valor medio del 11 por ciento, frente a menos del 1 por ciento en el endospermo, por lo que el salvado de maíz contiene una baja cantidad de minerales, sin embargo se puede encontrar algunos de ellos como son el fósforo, magnesio, potasio y calcio. (FAO, 1993)

#### 1.1.7.5 Compuestos fenólicos

Los fenoles son compuestos químicos ampliamente distribuidos en las plantas como producto de su metabolismo secundario, algunos de los cuales son indispensables para su funcionamiento y otros son útiles en los mecanismos de defensa bajo situaciones de estrés (Kim *et al*, 2003) y contra el ataque de organismos patógenos (Bakan *et al*, 2003). También se vincula el consumo de estos fitoquímicos con beneficios a la salud, debido a sus propiedades antioxidantes (Gallardo *et al*, 2006) y anticancerígenas (Zhaohui y Moghadasian, 2008).

Químicamente son compuestos que tienen al menos un anillo aromático al que está unido a uno o más grupos hidroxilo. Existe una gran variedad de compuestos fenólicos, y se clasifican en flavonoides, formados por dos anillos aromáticos unidos por un heterociclo oxigenado y que dependiendo del grado de hidrogenación y de la sustitución del heterociclo son, flavonoles, flavonas, isoflavonas, antocianos, proantocianidinas, flavanonas, etc. y se encuentran generalmente en forma de glicósidos, y los no flavonoides, compuestos benzoicos y cinámicos, llamados comúnmente ácidos fenólicos, que contienen un anillo aromático con diferentes grupos funcionales, y que pueden estar formando ésteres con los ácidos orgánicos. Otros compuestos de naturaleza polifenólica son estilbenos, taninos, ligninas y lignanos. Algunas de las propiedades de los productos de origen vegetal, como color, astringencia y aroma son debidas a la presencia de compuestos de este tipo. (Pedrola, 2005)

En cereales los fenoles se agrupan en solubles e insolubles o ligados. En el primer grupo están los fenoles libres, glucosilados y esterificados que se ubican en mayor cantidad en las capas periféricas de los granos (pericarpio, testa y células de aleurona), mientras que su concentración es menor en el endospermo (Yu *et al.*, 2001). El maíz (*Zea mays*) contiene más fenoles totales y mayor poder antioxidante que cereales como trigo, arroz y avena (Adom y Liu, 2002). El principal fenol es el ácido ferúlico, que representa alrededor de 85 % de los fenoles totales y se concentra en el pericarpio del grano en forma libre o esterificada a las heteroxilanas que constituyen la hemicelulosa de la pared celular (De la Parra *et al*, 2007),

Aunque hay trabajos sobre el contenido de fenoles en el grano entero de maíz (Sosulski *et al.*, 1982; Del Pozo–Insfran *et al.*, 2006; De la Parra *et al.*, 2007), pocos cuantifican estos compuestos en las estructuras del grano, a pesar de que su presencia tiene relevancia con propiedades particulares: el contenido de fenoles en el germen del grano de maíz está asociado con la tolerancia a *Fusarium spp* (Bakan *et al.*, 2003); los fenoles del endospermo participan en el desarrollo del color grisáceo en masa y tortilla (Salinas *et al.*, 2007) y los del pericarpio se relacionan con la tolerancia a plagas de almacén (Sen *et al.*, 1994). Existen trabajos que relacionan la dureza del grano de maíz con el contenido de fenoles (Bily *et al.*, 2004; Del Pozo–Insfran *et al.*, 2006), pero se desconoce si otras propiedades físicas del grano están asociadas con el contenido de estos compuestos.

### 1.2 Antocianinas

Las antocianinas son compuestos no nitrogenados que forman parte de la familia de los polifenoles y se definen como flavonoides fenólicos (Martínez, 2002).

Las antocianinas consiste en un grupo flavilio que a su vez está formado por una molécula de benzopirano unida a un anillo fenílico. Estos grupos se encuentran unidos a sacáridos. (Kong *et al.*, 2003).

Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas (Fig. 4).

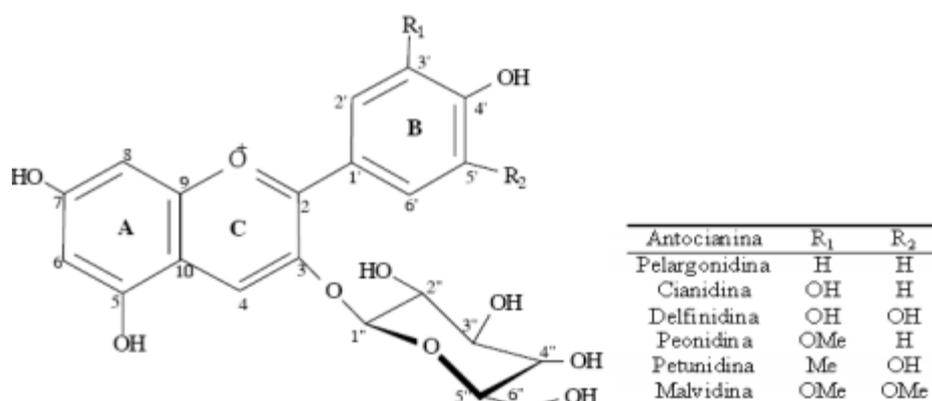


Figura 4. Estructura y sustituyentes de las antocianinas (Kuskoski *et al.*; 2003)

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen

desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas.

En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad.

Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzóico. (Stintzing *et al.*, 2002)

### *1.2.1 Factores que afectan la estabilidad de antocianinas*

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes artificiales, su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento (Wrolstad, 2000; Cevallos y Cisneros, 2004). Factores como la estructura química, pH, concentración, temperatura, presencia de oxígeno, ácido ascórbico y actividad de agua de la matriz determinan la estabilidad del pigmento.

#### *1.2.1.1 Efecto del pH y luz*

El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas (Figura 5). A valores de pH inferiores a dos, se encuentra en su forma más estable o de ión oxonio o catión flavilio (AH<sup>+</sup>) de color rojo intenso. A valores de pH cercanos a siete ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemicetal (B) y la forma chalcona (C), o de cadena abierta. Estas últimas, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a siete se presentan las formas quinoidales (A, A<sup>-</sup>) de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire (Hutchings, 1999).

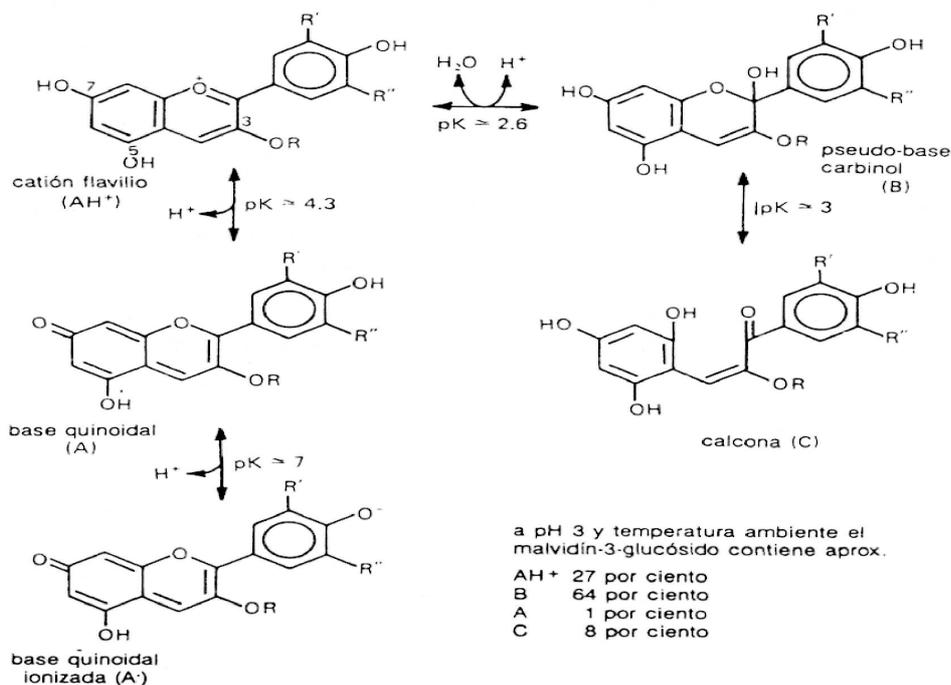


Figura 5. Antocianinas a diferentes valores de pH (Coultrate, 1984).

Sin embargo, pierden la intensidad de su color con el contacto de la luz, manteniéndose estable en condiciones ácidas, por lo que deben almacenarse bajo esas condiciones. En la industria alimenticia, son utilizadas en productos ácidos (con un pH de 4 o inferior), como jaleas, confituras, mermeladas, entre otros (Kong et al., 2003).

### 1.2.1.2 Efecto de la temperatura

Incrementos de temperatura resultan pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 con la consecuente producción de chalconas incoloras. (Timberlake, 1980)

### 1.2.1.3 Efecto del oxígeno y ácido ascórbico

El efecto del ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas ha sido explicado por Jurd, 1972 y Poesi-Langston, 1981, como una posible reacción de condensación entre el ácido y los pigmentos.

Otro factor importante sobre la estabilidad de las antocianinas es el contacto con el oxígeno, ya que son rápidamente oxidadas cuando se encuentran

principalmente en su forma quinoidal. Si este es excluido en el sistema no se observa deterioro del color.

#### *1.2.1.4 Efecto de la concentración de pigmentos y agua*

Hoshino *et al.*, 1981 demostraron que cuando la concentración de antocianinas alcanza valores altos, se presentan fenómenos de autoasociación entre dos cationes flavilio, dos formas hemicetal, dos bases quinoidales, e inclusive, entre una base quinoidal y un catión flavilio y protegiendo la molécula de antocianina. Por otro lado, incrementos en la actividad de agua del medio causan degradación de las antocianinas probablemente debido a una mayor interacción entre el agua y el catión flavilio para formar la pseudobase inestable (Garzón y Wrolstad, 2002; Olaya *et al.*, 2008)

#### *1.2.1.5 Efecto de los metales*

Las antocianinas cambian de color cuando forman complejos, quelatos o sales con iones sodio, potasio, calcio, magnesio, estaño, hierro o aluminio.

#### *1.2.1.6 Efecto de enzimas*

La inactivación de enzimas, mejora la estabilización de las antocianinas; las enzimas que tienen carácter b-glucosidasa hidrolizan el enlace glucosídico en el C-3, produciendo el correspondiente aglucón, el cual es incoloro.

#### *1.2.1.7 Copigmentación*

El color de las antocianinas puede ser estabilizado y enriquecido por reacciones de copigmentación (Rein, 2005). Este es un fenómeno que involucra la interacción de las antocianinas con los flavonoides, polifenoles, alcaloides, aminoácidos y consigo mismas, generando que el color de las antocianinas sea más intenso, brillante y estable, ya que estos compuestos la protegen de los efectos de pH, luz y calor (Jiménez, 2008).

### 1.3 Extracción de antocianinas

La extracción de las antocianinas es el primer paso para su determinación total e individual, la elección de un método de extracción es importante para su análisis y depende en gran medida de su naturaleza y de la fuente del material. Este procedimiento debe maximizar su recuperación realizando extracciones múltiples si es necesario, evitar la degradación natural y disminuir el tiempo de realización.

La naturaleza de la molécula permite su solubilidad en muchos disolventes, como son alcoholes, acetona y agua; para uso en alimentos se sugiere usar el etanol sobre el metanol por su grado de toxicidad. (Rodriguez y Wrolstad, 2001)

#### 1.3.1 Disolventes de extracción y procesamiento.

Se utilizan para la obtención de extractos naturales. Se acepta un límite máximo para la cantidad de solvente residual permanente en un alimento debido al principio activo de transferencia de masa. Concentraciones máximas de residuos de disolventes de extracción y procesamiento, presentes en los aromatizantes/saborizantes/colorantes. (Tabla 4)

Tabla 4. Concentración máxima de residuo de disolventes.

<b>Disolvente</b>	<b>mg/kg:</b>
Acetato de etilo	10
Acetona	2
Butano	1
1-Butanol	10
Ciclohexano	1
Diclorometano	2
Dióxido de carbono	Límite no especificado
Eter de petróleo	1
Eter dibutírico	2
Eter dietílico	2
Etil metil cetona	2
Hexano	1
Isobutano	1
Metanol	10
Propano	1
Tolueno	1
Tricloroetileno	2

(SICE, 2012)

### *1.3.1.1 Agua*

El elevado momento dipolar del agua y su facilidad para formar puentes de hidrógeno hacen que el agua sea un excelente disolvente. Una molécula o ión es soluble en agua si puede interactuar con las moléculas de la misma mediante puentes de hidrógeno o interacciones del tipo ión-dipolo.

### *1.3.1.2 Metanol*

Es un disolvente de tintas, colorantes, resinas y adhesivos. Se utiliza en la fabricación de película fotográfica, plásticos, jabones textiles, tintes de madera, tejidos con capa de resina sintética, cristal inastillable y productos impermeabilizantes. Sirve como materia prima para la fabricación de muchos productos químicos y es un ingrediente de decapantes de pinturas y barnices, productos desengrasantes, líquidos embalsamadores y mezclas anticongelantes.

El alcohol metílico tiene propiedades tóxicas que pueden hacerse evidentes tanto por exposición aguda como crónica. En experimentos con animales se ha demostrado que el alcohol metílico puede penetrar en la piel en cantidad suficiente como para causar una intoxicación mortal. En casos de intoxicación grave, generalmente por ingestión, el alcohol metílico actúa de forma específica en el nervio óptico, causando ceguera como resultado de la degeneración del nervio óptico, acompañada de cambios degenerativos en las células ganglionares de la retina y trastornos circulatorios en las coroides. La ambliopía es normalmente bilateral y puede aparecer pocas horas después de la ingestión, mientras que la ceguera total no se instaura hasta pasada una semana.

### *1.3.1.3. Etanol*

Se utiliza como anticongelante, aditivo alimentario y medio de crecimiento de levaduras. El alcohol etílico puede disolver muchas sustancias, por este motivo, se utiliza como disolvente en la fabricación de fármacos, plásticos, lacas, barnices, plastificantes, perfumes, cosméticos, aceleradores del caucho, etc.

La exposición prolongada a concentraciones superiores a 5.000 ppm causa irritación de los ojos y la nariz, cefalea, sopor, fatiga y narcosis. El alcohol etílico se oxida muy rápidamente en el organismo a dióxido de carbono y agua. El alcohol no oxidado se excreta en la orina y en el aire espirado, de manera que apenas se producen efectos acumulativos. El peligro de este consumo anómalo depende de la concentración de etanol, que si es superior al 70 % puede producir lesiones esofágicas y gástricas, y de la presencia de desnaturalizantes.

#### *1.3.1.4 Isopropanol*

Es otro disolvente industrial importante se emplea como antiséptico y sustitutivo del alcohol etílico en cosméticos, pero no puede utilizarse en productos farmacéuticos aplicados internamente. El isopropanol es un ingrediente de jabones líquidos, limpiacristales, aromatizante sintético de bebidas no alcohólicas y alimentos y producto químico intermedio.

No se conoce ningún caso de intoxicación industrial, aunque sí se ha detectado una mayor incidencia de cánceres de senos nasales y laringe en trabajadores que participaban en la producción de alcohol isopropílico. La causa podría ser el contacto con aceite isopropílico, que se obtiene como subproducto. La experiencia clínica demuestra que el alcohol isopropílico es más tóxico que el etanol, pero menos que el metanol. El isopropanol se metaboliza en el organismo dando acetona, que puede alcanzar concentraciones elevadas y, a su vez, es metabolizada y se excretada por los riñones y los pulmones. En el ser humano, las concentraciones de 400 ppm producen irritación leve de ojos, nariz y garganta. El curso clínico de la intoxicación por isopropanol es semejante al de la intoxicación por etanol. La ingestión de hasta 20 ml diluidos en agua causa solamente una suave sensación de calor y un ligero descenso de la presión sanguínea.

#### *1.3.1.5 Acetona*

La acetona se usa como disolvente de otras sustancias, como pinturas, barnices, lacas, grasas, aceites, ceras, resinas, tintas de imprenta, plásticos y

pegamentos. Se usa para fabricar plásticos, fibras, medicamentos, rayón, películas fotográficas, pólvora sin humo y otras sustancias químicas. También se emplea para limpiar y secar piezas de precisión.

La exposición a altas concentraciones de acetona puede causar la muerte, coma, pérdida del conocimiento, convulsiones y dificultad respiratoria. Puede dañarle los riñones y la piel de la boca.

La inhalación de concentraciones moderadas a altas por períodos breves puede causar irritación de la nariz, la garganta, los pulmones y los ojos. También puede causar intoxicación, dolor de cabeza, fatiga, estupor, mareo leve o fuerte, confusión, aceleración del pulso, náuseas, vómito y reducción del ciclo menstrual en las mujeres. (Tox Town, 2010)

### *1.3.2. Ácidos orgánicos*

La extracción de las antocianinas involucra ácidos que permite desnaturalizar la membrana del tejido vegetal y posteriormente disolver el pigmento, con el objetivo de obtener el catión flavilo, el cual es estable en un medio muy ácido. El ácido puede causar la parcial hidrólisis de los acilos en antocianinas aciladas, especialmente aquellas con ácidos dicarboxílicos tal como el ácido manólico, por lo que es aconsejable el uso de ácidos débiles, tales como el ácido tartárico o cítrico para mantener intactos los sustituyentes dicarboxílicos. (Castañeda, 2009; Escribano Bailón, 2004)

#### *1.3.2.1 Ácido acético*

Líquido incoloro de olor característico, miscible en agua, con un pKa de 4.75; se usa en la fabricación de fármacos, tintes, plásticos, aditivos de alimentos e insecticidas.

#### *1.3.2.2 Ácido láctico*

Líquido translúcido incoloro o amarillo pálido, de olor característico, soluble en agua con un pKa de 3.86; se usa como acidulante y conservador en productos alimenticios,

fabricación de cerveza, vinos, sidras y alcoholes (acelera el proceso de fermentación y proporciona bouquet), emulsificantes para pastelería, fabricación de quesos, mantequilla, yogurt, cremas, etc., fabricación de dulces y chocolates rellenos Mermeladas y confituras, fabricación de lactatos, utilizados en alimentos, medicina y como disolventes.

#### *1.3.2.3 Ácido cítrico*

Es un sólido incoloro, traslúcido o blanco, que se presenta en forma de cristales, granular o polvo, es anhidro o contiene una molécula de agua de hidratación, es un acidulante ampliamente usado, inocuo con el medio ambiente. Es prácticamente inodoro, de sabor ácido no desagradable, soluble en agua, éter y etanol a temperatura ambiente, con un pKa de 3.08

Es producido mediante fermentación usando carbohidratos naturales, tales como azúcar y dextrosa como sustratos, y *Aspergillus niger* como organismo de fermentación.

El ácido cítrico es un buen conservador y antioxidante natural que se añade industrialmente como aditivo. Sus funciones son como agente secuestrante, agente dispersante y acidificante.

#### *1.3.2.4 Ácido tartárico*

Cristales incoloros, o polvo blanco, transparentes o translúcidos muy resistentes, inodoro, bajo a moderadamente corrosivo con el tiempo, de sabor fuertemente ácido, estable en contacto con el aire ó la luz, soluble en menos de una parte de agua destilada y en 2,5 partes de alcohol; soluble en glicerina; prácticamente insoluble en éter y en cloroformo. Las soluciones de éste ácido son astringentes y mediana-mente irritantes, presenta un pKa de 3.03

Como acidificante y conservante natural en mermeladas, helados, gelatinas, sumos, conservas y bebidas; como efervescentes en bebidas carbonatadas, como emulsionante y conservante de la industria panificadora y para elaboración de caramelos y golosinas.

### *1.3.2.5 Ácido succínico*

Cristales blancos, inodoros, solubles en agua con un pKa de 4.20; ácido de origen natural, presente en la mayoría de frutas y vegetales. Es sintetizado comercialmente a partir del ácido acético. Actúa como regulador de acidez y potenciador del sabor. Se usa en confitería, panificación, etc. (New Jersey Department of Health, 2012)

## *1.4 Colorantes*

La creciente preocupación por la toxicidad de los colorantes sintéticos usados en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos ha sido investigada por Hallagan, 1991 y Lauro, 1991 donde reportaron que los colorantes rojo No. 2 y 40 se han prohibido en Austria, Japón, Noruega y Suecia, pero el rojo No. 40 aún se encuentra en escrutinio en Estados Unidos, estos hallazgos se relacionan con las modificaciones de la hiperactividad de niños de edad escolar, lo cual se puede considerar como un mal neuronal agudo (Breakey et al, 2002, McCann et al, 2007) Estos indicios son suficientes para disminuir la demanda de colores artificiales a favor del consumo generalizado de colorantes naturales como las antocianinas (Huck y Wilkes, 1996).

### *1.4.1 Encapsulación*

La encapsulación es una técnica que se emplea para proteger los aditivos utilizados en la industria de alimentos, esta técnica tiene diferentes propósitos en un producto alimenticio, entre los que se destacan: la conservación, fortificación y liberación controlada en el tiempo de nutrientes, disminución de la higroscopicidad, transformación de sabores líquidos a polvos, estabilidad durante el almacenamiento, mejoramiento de cualidades organolépticas y funcionales de productos alimenticios, etc. Los principales aditivos encapsulados en la industria de alimentos son: ácidos, colorantes, pigmentos, enzimas, microorganismos, sabores, especies, grasas y aceites, vitaminas, minerales, sales, edulcorantes, gases y agentes leudantes. La selección del material de recubrimiento es el paso más importante para obtener un producto encapsulado porque dependiendo de sus propiedades, se puede cumplir con los requerimientos de protección. El método de encapsulación se elige de

acuerdo a la aplicación requerida, el tamaño de cápsula deseado, el material a encapsular, el costo y las propiedades físicas y químicas del recubrimiento (Sandoval, 2004)

Los procesos de encapsulación se pueden dividir en dos, procesos químicos y mecánicos: Los procesos químicos se dividen en técnicas de coacervación, co-cristalización, polimerización interfacial, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica, atrapamiento por liposomas e inclusión molecular, dentro de los procesos mecánicos se encuentran las técnicas de secado por aspersion, secado por congelamiento/enfriamiento y extrusión (Madene et al, 2006, Yañez et al; 2002)

Los agentes encapsulantes usados como polisacáridos destacan, el almidón, maltodextrina, jarabe de maíz, goma arábica, agar, fibras y carbometilcelulosa; lípidos como el ácido estearico, mono y diglicéridos y lecitinas, y proteínas greñetina, caseína, lactosuero, soya y trigo. (Parras, 2010)

#### *1.4.2 Medición de color*

El color es una sensación subjetiva que produce la luz transmitida o reflejada por el ojo humano. El color de un alimento es importante desde el punto de vista comercial ya que para poder ser aceptado debe tener el color esperado por el consumidor.

Hay dos procesos fundamentales para medir el color: sensorial e instrumental. En el primer grupo, la medición sensorial estricta consiste en hacer uso de un panel de evaluadores entrenados, usando referencias. El sistema visual humano tiene la habilidad para discriminare entre colores, pero poca memoria visual, por lo que la valoración de color ayudada por patrones mejora las valoraciones visuales. (Heredia, 2009) El método instrumental consiste el uso de técnicas en las cuales permite medir el color externo de los alimentos en el cual se mide la transmitancia o reflectancia. Este método se conoce como colorimetría triestímulos considerado uno de los más rápidos y fáciles de desarrollar, el instrumento a usar es un espectrofotómetro o colorímetro triestímulo.

## JUSTIFICACIÓN

El color es una de las características sensoriales a las que mayor énfasis da el consumidor a los alimentos. El uso de colorantes artificiales ha dado paso a que se cuestione sobre su efecto tóxico, por esta razón se ha buscado la forma de remplazarlos por colorantes de origen natural, ya que estos colorantes no necesitan certificación por ser del grado GRAS.

Las antocianinas al ser moléculas con propiedades benéficas para la salud e impartir color son la razón de la siguiente investigación.

Sin embargo, las antocianinas al ser moléculas poco estables frente a varios factores ambientales se busca condiciones de extracción que proporcionen altos rendimientos, así como su estabilización.

El maíz es uno de los principales productos alimenticios de México y ha sido de gran importancia en la alimentación diaria de los mexicanos; sin embargo, el maíz de color es producido y consumido en regiones muy específicas, por lo que se busca la forma de impulsar su producción, usos y consumo, es por eso que el maíz morado, criollo (*Zea mays* L.) es la fuente que se ha escogido para la obtención de antocianinas.

Las antocianinas se encuentran localizadas tanto en el pericarpio, como en la capa de aleurona del maíz, por ello esta investigación se realizó sobre el salvado del maíz, el cual contiene estos componentes.

## OBJETIVO GENERAL

Identificar las condiciones que presentan mayor rendimiento de extracción de antocianinas del salvado de maíz morado (*Zea mays L.*) así como estabilizarlo en un vehículo para su aplicación a los alimentos.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las condiciones de extracción: tiempo, cantidad de disolvente, disolventes y ácidos orgánicos para obtener los mejores rendimientos de antocianinas.
- Cuantificar por el método de pH diferencial y HPLC para conocer la cantidad y perfil de antocianinas en el salvado de maíz.
- Cuantificar polifenoles totales para conocer la relación que hay con las antocianinas.
- Extraer a escala preparativa para obtener un extracto rico en antocianinas que será implementado en alimentos.
- Encapsular con amaranto, inulina y maltodextrina para obtener un colorante con mayor facilidad de empleo, así como su estabilización.
- Aplicar en diferentes alimentos con el fin de conocer si estos colorantes son viables para su uso.

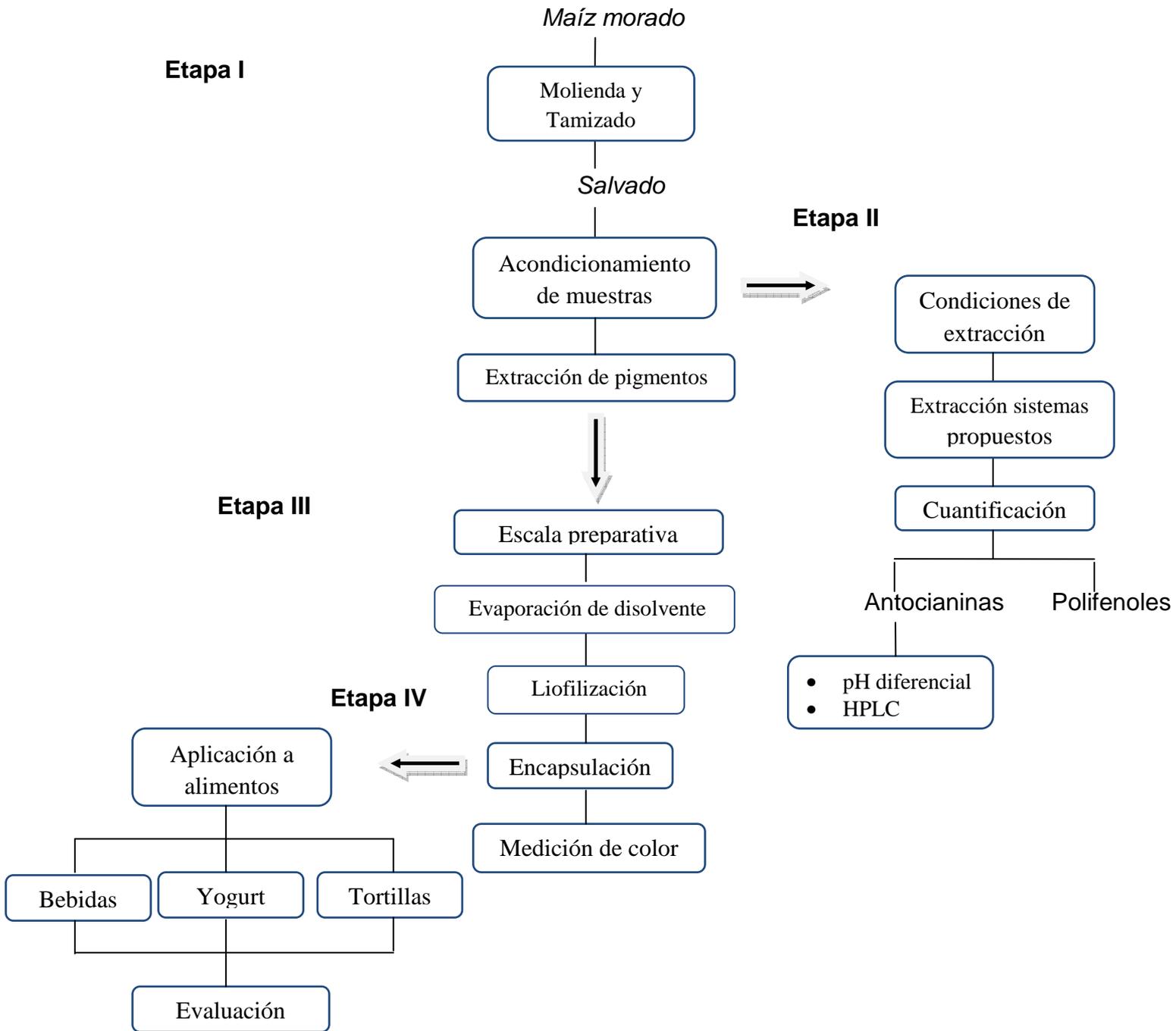
## HIPÓTESIS

El uso de disolventes a distintas concentraciones con agua tendrá diferentes rendimientos de extracción de antocianinas.

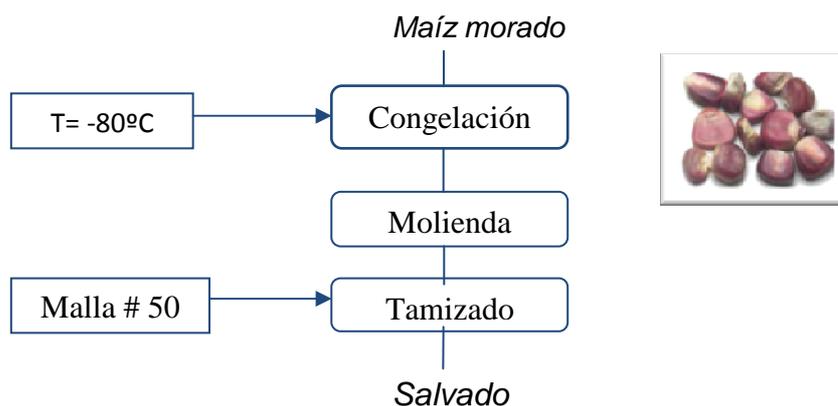
Con el uso de diversos ácidos orgánicos se obtendrá un rendimiento igual que al emplear ácido acético.

## 2 METODOLOGÍA

### 2.1 DIAGRAMA GENERAL



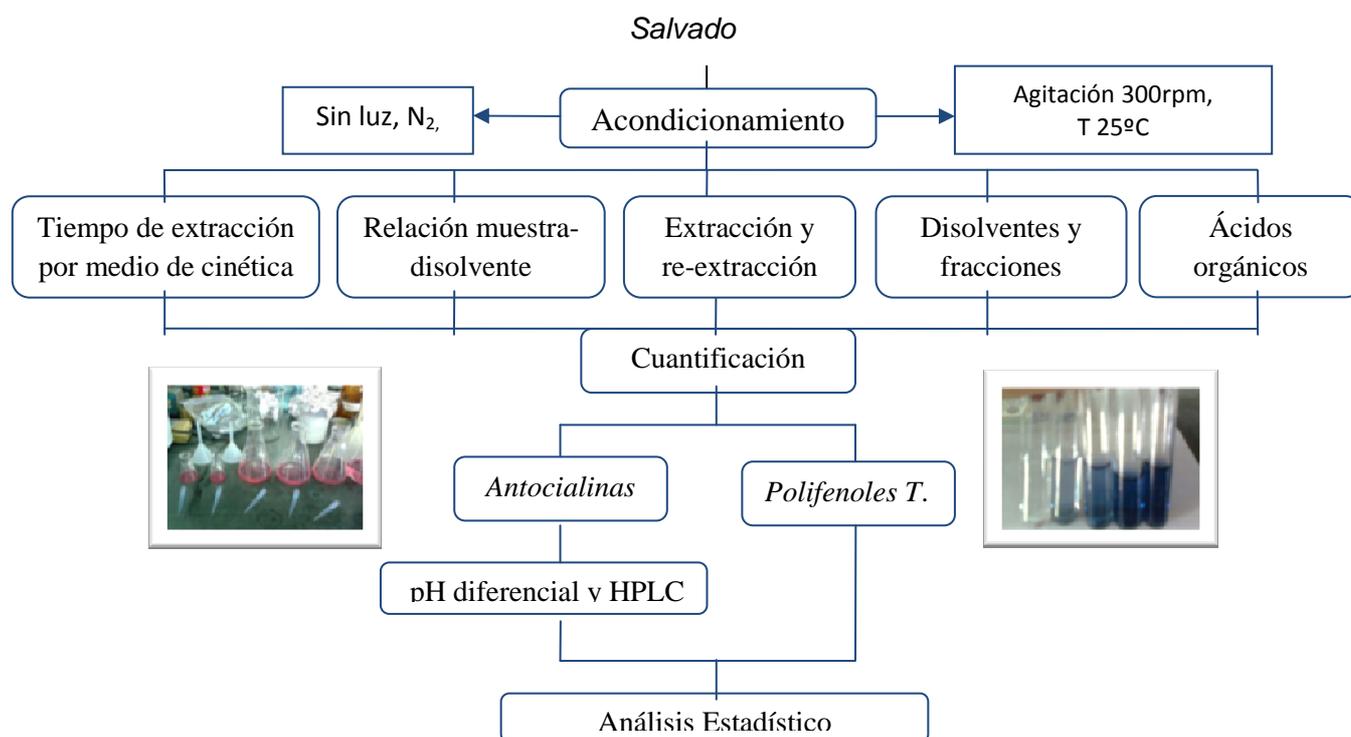
## 2.2 ETAPA I.



### 2.2.1 Obtención del salvado

Se recolectó maíz morado criollo de la localidad de Ixtenco, estado de Tlaxcala, México. Para la preparación de la muestra, el maíz se congeló por 24 horas a -80°C en un ultracongelador Harris, se molió en licuadora marca Oster de una velocidad y se tamizó en una malla número 50, la fracción que no pasó por la malla se molió dos veces más en un molino de café GX410011 marca KRUPS y se volvió a tamizar con el fin de retirar la mayor cantidad de almidón; la fracción obtenida fue del 23% siendo este el salvado con lo que se realizó los experimentos.

## 2.3 ETAPA II



### *2.3.1 Acondicionamiento de muestras*

Para el acondicionamiento del salvado se pesó un gramo de muestra, se agregó el disolvente en cuestión 10mL, ácido acético glacial al 1% donde las soluciones alcanzaron un pH de 3, los matraces se cubrieron con papel aluminio para evitar la degradación por efecto de la luz; para evitar la degradación por el oxígeno se empleó gas nitrógeno. Se sometieron a una agitación de 300rpm a temperatura controlada de 25°C en una agitadora Thermo scientific MyxQ 4000. Se tomó como referencia al metanol y al ácido acético. Todas las pruebas realizadas se hicieron por triplicado.

### *2.3.2 Determinación de tiempo*

Para obtener el tiempo de extracción de las antocianinas se realizó una cinética con 10mL de metanol (Fermont) 0.1mL y de ácido acético glacial ACS (Fermont); ambos grado reactivo. Se midió antocianinas totales a cada hora durante las primeras cuatro horas y finalizando a las 24 horas; esto se realizó por triplicado.

### *2.3.3 Determinación de relación muestra disolvente*

Se prosiguió a determinar la relación de muestra-disolvente, con las proporciones 1:10, 1:50 y 1:100 con metanol/ ácido acético glacial al 1% grado reactivo, cada una por triplicado.

### *2.3.4 Extracción simple y múltiple*

Después de obtener la relación muestra disolvente se realizó una extracción simple y múltiple a dos diferentes tiempos, el primero donde hubo la mayor extracción de antocianinas (1 hora) y el segundo donde ya no hubo variaciones de extracción con el fin de obtener la máxima extracción de antocianinas (4 horas). Cada una de las extracciones se realizó con metanol a diferentes concentraciones; se empleó 10mL de metanol y ácido acético al 1% y 8mL de metanol, 2mL de agua destilada y 1% de ácido acético glacial. Al término de la primera extracción se filtró y a la muestra de salvado se volvió a someter a otra extracción con las mismas condiciones de luz, tiempo, temperatura, agitación, gas N<sub>2</sub>, disolvente y ácido.

### *2.3.5 Extracción con disolventes a diferentes concentraciones*

Una vez obtenido el tiempo de extracción, se prosiguió a determinar las extracciones con diferentes disolventes y cada uno de ellos a diferentes concentraciones. Los disolventes a emplear son:

Etanol, acetona e isopropanol (Fermont) al 100, 80, 50 y 20% siendo el resto agua destilada con 1% de ácido acético glacial grado reactivo y como referencia se uso metanol al 80% y agua 100% con ácido acético glacial al 1%. Cada uno por triplicado

### *2.3.6 Extracción con diferentes ácidos orgánicos*

Al obtener el disolvente y la fracción que presenta mayor rendimiento de extracción se estudió el rendimiento en las extracciones con el uso de ácidos orgánicos diferentes. Ácido acético glacial (ACS Fermont), ácido láctico (Baker Analyzed), ácido cítrico (J.T. Baker), ácido tartárico (Aldrich) y ácido succínico (J.T. Baker).

Las extracciones se realizaron con 8mL de etanol, 2mL de agua destilada acidificada con 1% de cada ácido propuesto; cada uno por triplicado.

### *2.3.7 Antocianinas totales por pH diferencial*

A cada solución se le determinó antocianinas totales por el método de pH diferencial de acuerdo a Giusti y Wrosltad (2001). Que consiste en tomar una alícuota de 200  $\mu$ l de la solución obtenida en 1800  $\mu$ l de buffer de cloruro de potasio a pH 1 y otra alícuota en buffer de acetato de sodio a pH de 4.5; se midieron en el espectrofotómetro de UV-Vis GBC-Cintral a una longitud de onda de 510nm y a 700nm. Para poder obtener las antocianinas totales se expresa en cianidina- 3-glucósido de acuerdo a la siguiente expresión: Antocianinas (mg/L)=  $\Delta A \times PM \times FD \times 1000 / (\epsilon \times L)$

Donde  $\Delta A$  (cambio en la absorbancia) =  $(A_{510} - A_{700})$  a pH 1 –  $(A_{510} - A_{700})$  a pH 4.5;

Peso molecular = 449.2 g/mol para cianidina-3-glucósido;

FD = factor de dilución= 10;

L = longitud de paso de celda en cm= 1;

$\epsilon = 26900$  (coeficiente de extinción molar) para cianidina-3-glucósido; en metanol

1000 = factor de conversión de gramos (g) a miligramos (mg)

### *2.3.8 Cuantificación de antocianinas por HPLC*

Las muestras más representativas, tanto de disolventes como las que se extrajeron con diferentes ácidos orgánicos fueron cuantificadas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con una columna Hypersil Gold 250 x 4.6, 5nm con el método empleado en el laboratorio con las fases (A) ácido acético 10% y (B) Metanol/Agua/ácido acético (50:40:10) grado HPLC Se realizaron por triplicado.

### *2.3.9 Polifenoles Totales*

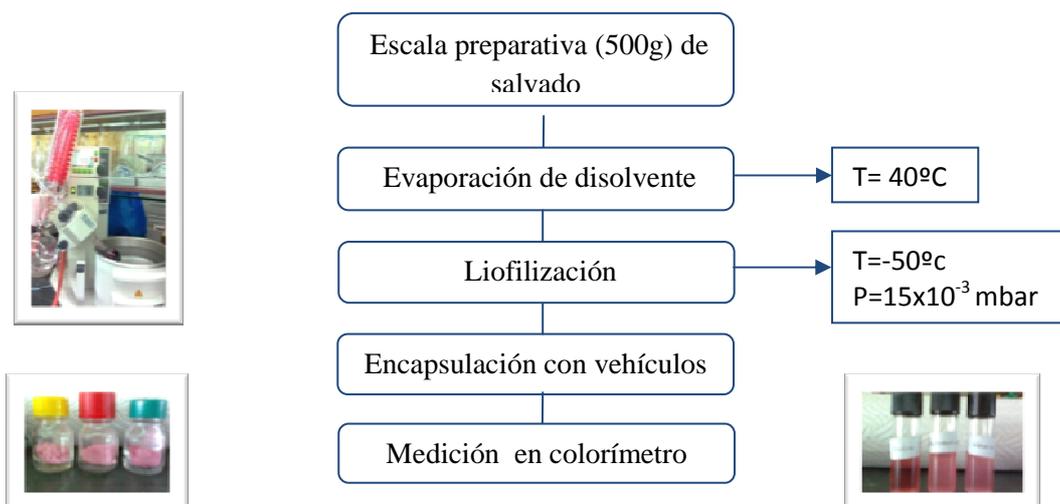
Se determinó polifenoles totales por el método de Matthaus (2002). Tomando 2mL del extracto, se lleva a 5mL con HCl al 0.3%. Se tomó una alícuota de 100 $\mu$ l de la nueva solución y se adiciona 2mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2%, después de 2min se agregaron 100 $\mu$ l de reactivo de fenol-folin-ciocalteu diluido con agua 1:1. Después de 30min se midió absorbancia a 750nm con el espectrofotómetro de UV-Vis GBC- Cintral.

La concentración de polifenoles se calculó usando ácido tánico como estándar por lo que fue necesario realizar una curva patrón con 0.0, 0.25, 0.50, 0.75 y 1mg de ácido tánico. Los resultados se expresan como  $\mu$ g de ácido tánico/g de muestra.

### *2.3.10 Análisis estadístico*

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ) para obtener que muestras eran diferentes estadísticamente entre sí.

## 2.4 ETAPA III.



### 2.4.1 Escala preparativa

Con las condiciones más favorables se decidió realizó la extracción a escala preparativa con 500g del salvado del maíz morado criollo, se eliminó el disolvente en un rotavapor Buchi R-215 a una temperatura de 40°C para evaporar el etanol se uso a una presión de 45mbar y para el agua a una presión de 21mbar. El extracto se liofilizó en una liofilizadora Labconco a una temperatura de -50°C y a una presión de 15 x 10<sup>-3</sup> mbar.

### 2.4.2 Preparación de colorantes

Se realizó el colorante en polvo y líquido usando tres vehículos como soporte, éstos fueron maltodextrina, inulina y amaranto.

Para realizar el colorante en polvo se pesó una proporción que tuviera 4.5mg de antocianinas provenientes del extracto obtenido, el cual después de ser liofilizado se encuentra en forma de pasta y se mezcló con los vehículos: para inulina una relación extracto/vehículo 1:20, amaranto 1:2 y dextrina 1:7 incorporándolo de manera uniforme haciendo uso del mortero hasta obtener un polvo homogéneo; para el colorante líquido se peso el 0.25% de antocianinas provenientes del colorante anterior y se aforó a 5mL con agua destilada acidificada al 1%.

Los colorantes sólidos y líquidos se envasaron en frascos de plástico y viales de vidrio respectivamente, cada uno de ellos etiquetados.

### 2.4.3 Medición de color

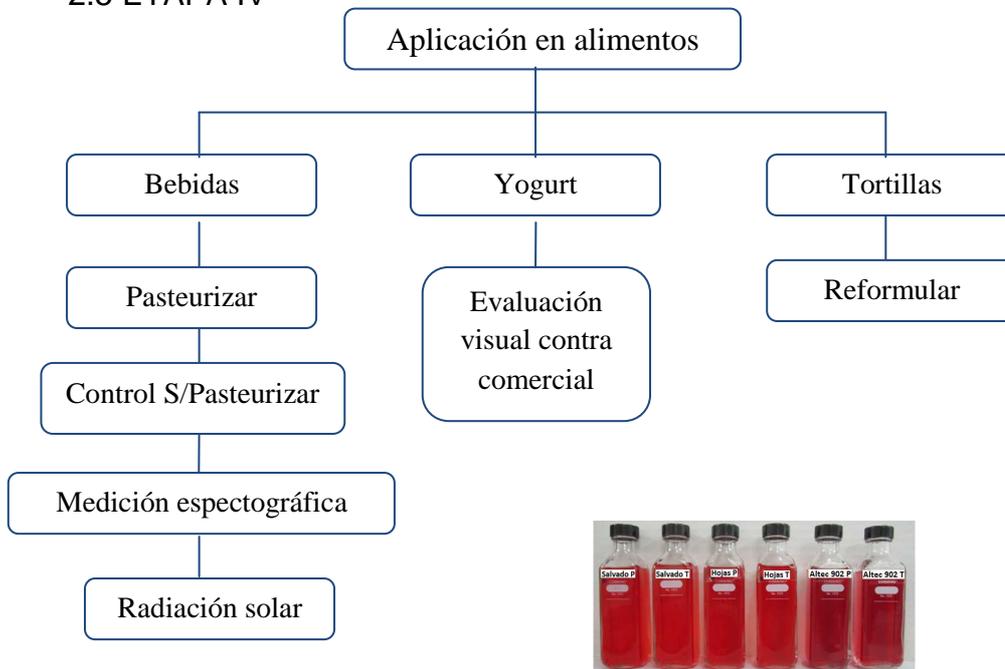
A cada uno de los colorantes se midió color en un colorímetro Minolta spectrophotometer cm-3600d. Para los colorantes en polvo se hicieron determinaciones por triplicado y para los líquidos por duplicado. Se midieron los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  Donde:

$L^*$  = Luminosidad.

$a^*$  = Tendencia del color rojo (positivo) o verde (negativo).

$b^*$  = Tendencia del color amarillo (positivo) o azul (negativo).

### 2.5 ETAPA IV



#### 2.5.1 Bebidas

Se elaboraron las bebidas con una base previamente preparada por el grupo Altecsa, en un litro contiene 86g de azúcar, 1.8g de ácido cítrico, 0.18g de benzoato de sodio y debe estar a un pH de 3. Se pesaron 3.5g de extracto de antocianinas provenientes del salvado sin vehículo y se disolvió en 12mL de la base, se sometieron a calentamiento hasta alcanzar una temperatura entre 80°- 85°C por 1 min, en este momento se envasó en frascos de vidrio y se les dio un choque térmico colocándolas en un baño de hielo. También se realizaron bebidas con un color estándar (black carrot) proporcionado por la misma empresa y con un colorante extraído de hojas de maíz morado. Cada

uno de ellos se realizó por duplicado. Para cada uno de los colorantes se realizó una bebida sin pasteurización como testigo. Posteriormente se evaluó el % de color perdido después del tratamiento de pasteurización, se midió el % de fuerza de color aparente inicial y residual a las 13 horas del experimento, tanto en las bebidas pasteurizadas y las testigo que son sin pasteuriza. Las bebidas fueron expuestas a luz solar y se midió el % de fuerza aparente residual a diferentes tiempos.

### *2.5.2 Yogurt*

Se midió 5mL de yogurt natural y se le agregó 0.25g de cada colorante realizado, se mezcló hasta obtener un color uniforme. En este caso se realizó una prueba visual con diez jueces no entrenados. Donde se evaluó el color por medio de una escala estructurada numérica, donde 0 es la menor intensidad y 10 es la mayor y teniendo como referencia un yogurt comercial, en donde este tenía el valor número 5.

### *2.5.3 Tortillas*

Para la elaboración de tortillas se pesó la proporción de colorante encapsulado que tuviera 3.5mg de antocianinas y se mezcló con 25g de MASECA para obtener una harina homogénea en cuanto a color. Posteriormente se hidrató la harina de maíz con 20mLde agua hasta obtener la masa, se procedió a realizar las tortillas y cocer.

Como experimento alterno, se elaboraron tortillas empleando el colorante encapsulado directamente a una masa preparada.

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 ETAPA I

Preparación del maíz para obtener el salvado, el cuál será la fuente de obtención de antocianinas.

##### 3.1.1 Obtención del salvado

Después de congelar, moler el maíz y de ser tamizado tres veces por una malla # 50, se obtuvo un 25% de salvado, el cual presenta en su mayoría pericarpio, sin embargo de acuerdo al tipo de molienda también presenta almidón.



Figura 6. Salvado de maíz

Se encontró que un punto crítico para la obtención de la muestra es la congelación del maíz, esto se debe a que las semillas se contraen logrando desprender con mayor facilidad el pericarpio, así como también una fácil molienda, es importante que el salvado se mantenga lo más frío posible para las próximas moliendas, hasta obtener la muestra como se observa en la figura 6.

Con lo que respecta al tamizado es importante realizarlo hasta que se elimine la mayor cantidad posible de almidón, esto para evitar que la proporción en el salvado sea la menor posible.

El proceso industrial para obtener el salvado comienza acondicionando el grano añadiéndole agua o vapor con el fin de endurecer la envoltura de maíz para separarlo, a su vez con el germen del grano de maíz. La separación del germen se realiza por medio de una máquina que lleva un tambor horizontal giratorio de forma cónica, al pasar el maíz por este aparato, el salvado y el germen son aislados del grano en gran parte, y el endospermo queda roto en trozos. Las finas partículas de corteza y germen pasan a través de tamices y

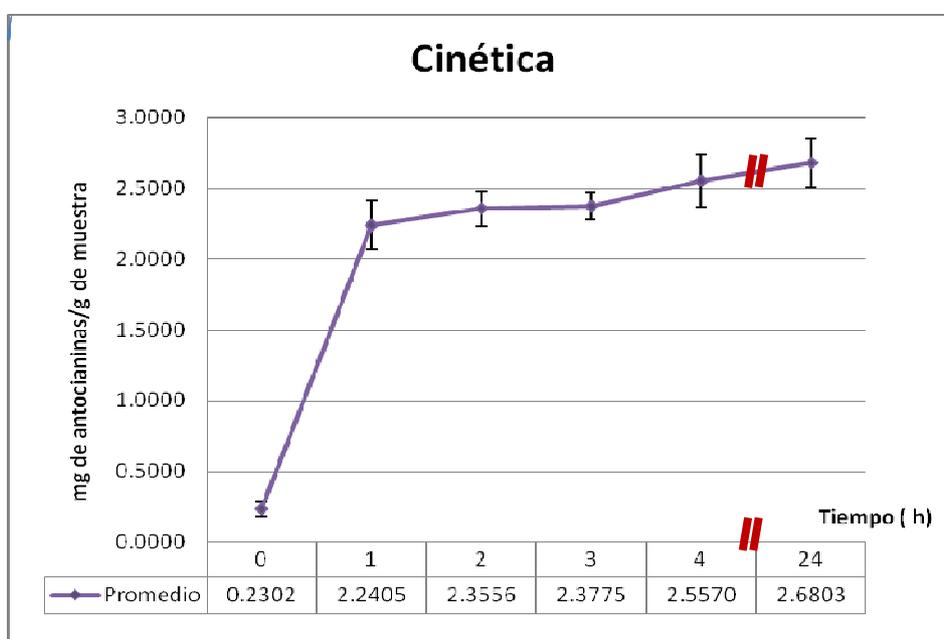
son separadas así del endospermo. El resto pasa por zarandas, en donde las partículas se clasifican por tamaños y son enviadas a aspiradores centrífugos que acaban de separar el salvado. (Tecnologías limpias, 2004)

### 3.2 ETAPA II

En esta etapa se obtuvieron las condiciones de tiempo, relación muestra-disolvente, extracción simples y múltiples, extracciones con disolventes a diferentes concentraciones, extracciones con ácidos orgánicos, cuantificación de antocianinas por el método pH diferencial y HPLC así como la cuantificación de polifenoles totales. Esto con el fin de obtener los mayores rendimientos de antocianinas con la menor cantidad de insumos.

#### 3.2.1 Determinación de tiempo

Para la determinación del tiempo se ha usado metanol-ácido acético, y se han mantenido constantes la temperatura, agitación y nitrógeno, se realizó por 24 horas, cuantificando antocianinas totales por el método de pH diferencial a cada hora en las primeras cuatro horas. Esto se realizó por triplicado.



\*La gráfica muestra el promedio del experimento por triplicado

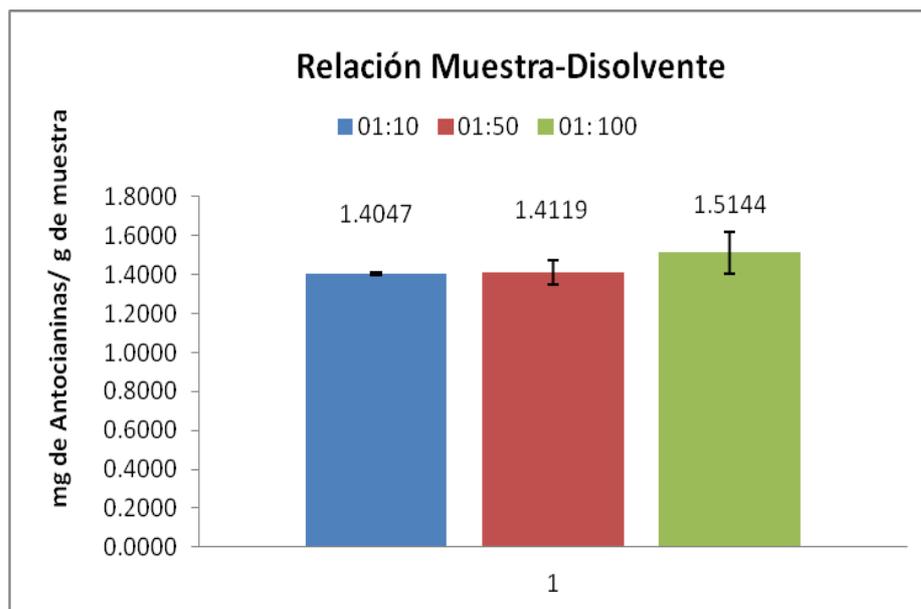
Gráfica 1. Cinética de Tiempo vs Antocianinas totales

Como se observa en la gráfica 1, se tiene que la máxima extracción se da a las 24 horas con un promedio de **2.6803mg** de antocianinas/g muestra, Sin embargo el mayor incremento de extracción en esta cinética se observa del  $t_0$  al  $t_1$  que va de **0.2302mg** a **2.2405mg**, en el  $t_4$  se encuentra de hay una extracción de **2.5570mg** lo que indica que no hay diferencia significativa con la cuantificación a las 24 horas, esto muestra que a partir de este tiempo la cantidad de antocianinas se mantiene constante gracias a la aplicación del gas nitrógeno para evitar la oxidación de las mismas.

En trabajos previos realizados en el laboratorio, el metanol ha sido el disolvente que presenta una mayor extracción y se parte de que el tiempo de extracción mínimo es de 24 horas ya que se encontró que después de 48 horas no es posible una mayor extracción de antocianinas y estas tienden a degradarse. Por lo que al querer reducir el tiempo la cinética se realizó empleando las mismas condiciones manteniéndose constante hasta las 24 horas. Zhendong et al, 2010 en su publicación indican que el tiempo de extracción de antocianinas en semilla y mazorca morada es de 24hr empleando metanol donde se encontró entre 0.56 y 0.92mg de antocianinas/g de muestra, en comparación con 2.2405mg obtenidos en la primera hora, una de las razones por la que la cantidad de antocianinas cuantificadas en dicho trabajo pudo ser que a las 24 horas las antocianinas se hayan degradado o la maduración del maíz fuera diferente. Gorriti et al, 2009 publicaron un estudio donde encontraron que el mejor tiempo de extracción se realizó a las 4 horas, siendo extraídas con etanol al 20% que fue el disolvente que presentó mejores resultados.

### *3.2.2 Relación muestra-disolvente*

Para realizar las extracciones se empleó metanol-ácido acético como disolvente, por un lapso de 4 horas ya que en este tiempo no presenta diferencia estadística con el máximo que fue a 24 horas. Se realizó un análisis de varianza para poder identificar si hay diferencia estadística en las extracciones con diferentes proporciones de disolvente-muestra.

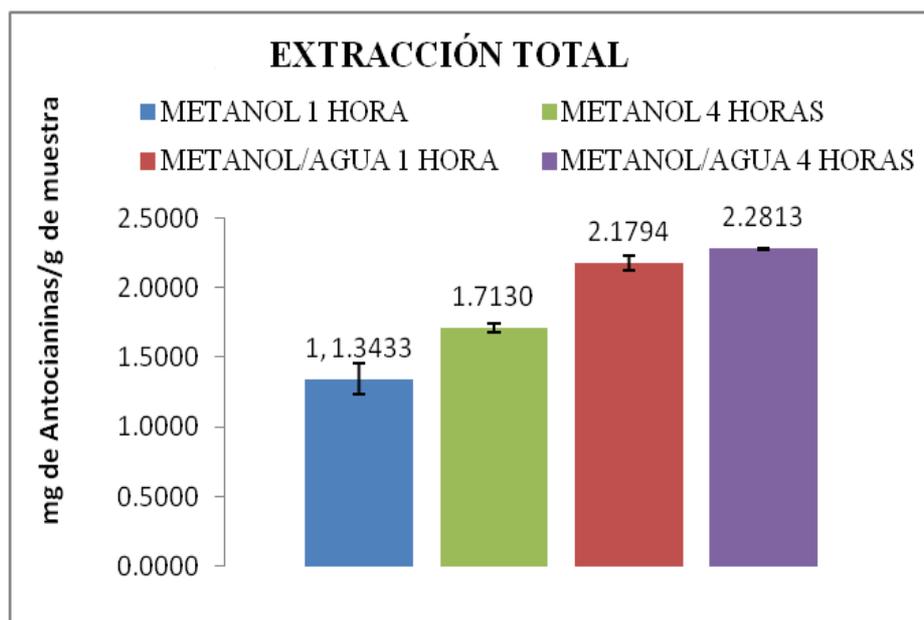


Gráfica 2. Relación muestra disolvente

De acuerdo a los resultados estadísticos obtenidos, se encontró que no existe diferencia significativa entre las proporciones de muestra con disolvente (Gráfica 2), es por eso que se decidió usar la relación 1:10, con el fin de reducir la mayor cantidad de disolvente. Gorriti et al, 2009 usaron la relación de muestra volumen de 2.5:200, mientras que Jing y Giusti, 2001 realizaron sus extracciones 1:25 por una hora lo que esto indica que la proporción en esta investigación se reduce apreciablemente la cantidad de disolvente a usar.

### 3.2.3 Extracción simple y múltiple

En este caso las extracciones se realizaron con metanol-ácido y metanol-agua-ácido, esto con el fin de una mayor solubilidad de las antocianinas con la presencia del agua. Se optó por hacer una extracción simple y múltiple, tanto a 1 hora como a las 4 horas para poder asegurarse que se extraiga la mayor cantidad de las antocianinas en el menor tiempo, (Gráfica 3) los resultados se expresan en mg de antocianinas/g de muestra.



\*Cada extracción se realizó en el mismo tiempo indicado, donde la extracción múltiple se realizó en el salvado previamente usado y manteniendo las mismas condiciones.

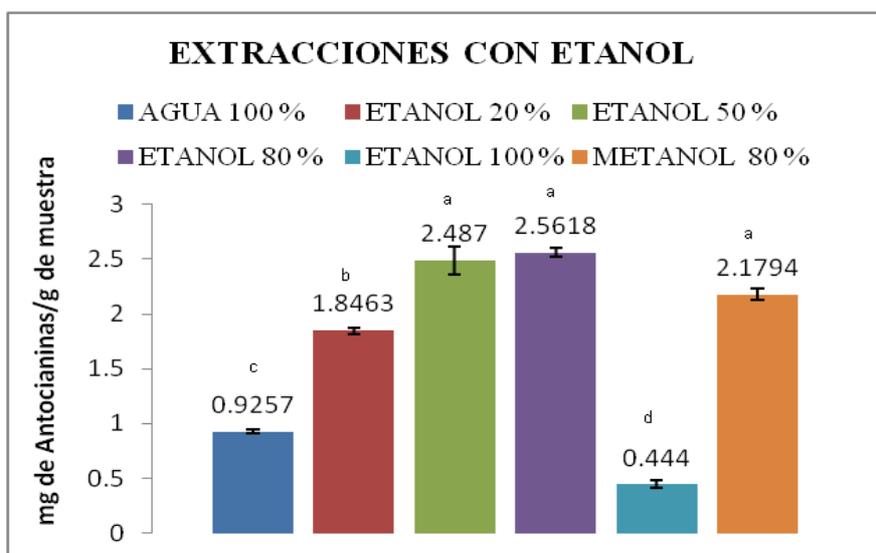
Grafica 3. Extracción total

De acuerdo a los resultados obtenidos (Gráfica 3) se tiene que hay una mejor extracción en Metanol-Agua que en Metanol, sin embargo no se observa diferencia para 1 hora y para 4 horas **2.1794mg** y **2.2813mg** respectivamente, por lo que esto corrobora que se puede disminuir el tiempo si se realiza una extracción múltiple a 1 hora. En la segunda extracción se logró obtener en promedio el 25% de antocianinas totales.

Salinas et al, 2005 presenta en su trabajo la extracción de antocianinas de cuatro variedades de maíz, la cantidad de 1.35mg a 2.59mg de antocianinas /g de muestra realizando 4 extracciones sucesivas usando como disolventes metanol-agua-acético y etanol-agua-acético 10:9:1, mientras que en el presente trabajo se obtuvo en promedio la cantidad de 2.1794mg de antocianinas /g de muestra en sólo dos extracciones. Es por eso que en los experimentos posteriores se realizará una segunda extracción a la muestra reduciendo el tiempo; con lo que respecta a la cantidad total de disolvente a emplear sigue estando por debajo a lo que se han usado en los trabajos indicados anteriormente.

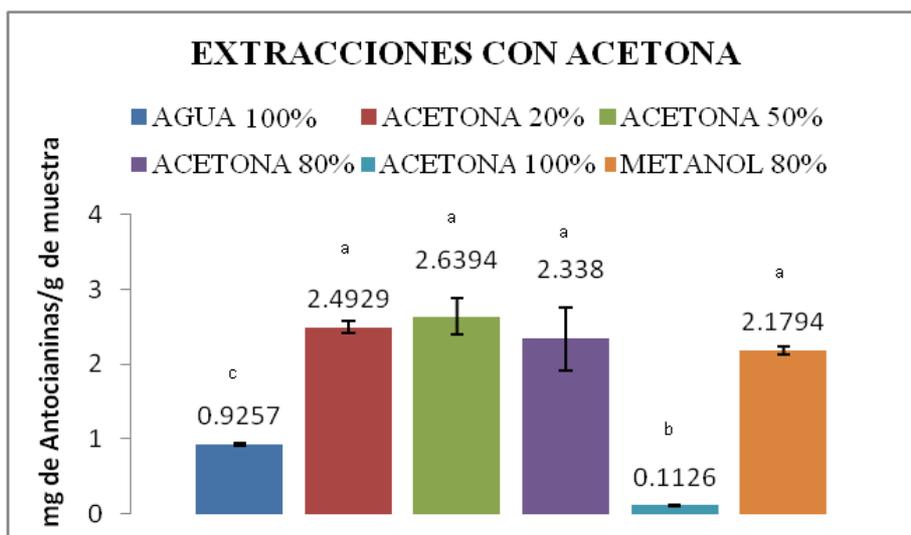
### 3.2.4 Extracciones con disolventes a diferentes concentraciones

Después de obtener el tiempo, cantidad de disolvente a usar y realizando una extracción múltiple, se continuó con la extracción de antocianinas con diferentes disolventes a distintas concentraciones; 20, 50 80 y 100%, usando ácido acético al 1% en todas ellas. Se determinó antocianinas totales por el método de pH diferencial se realizó por triplicado los promedios de cada uno de ellos se expresan en mg de antocianinas/g de muestra.



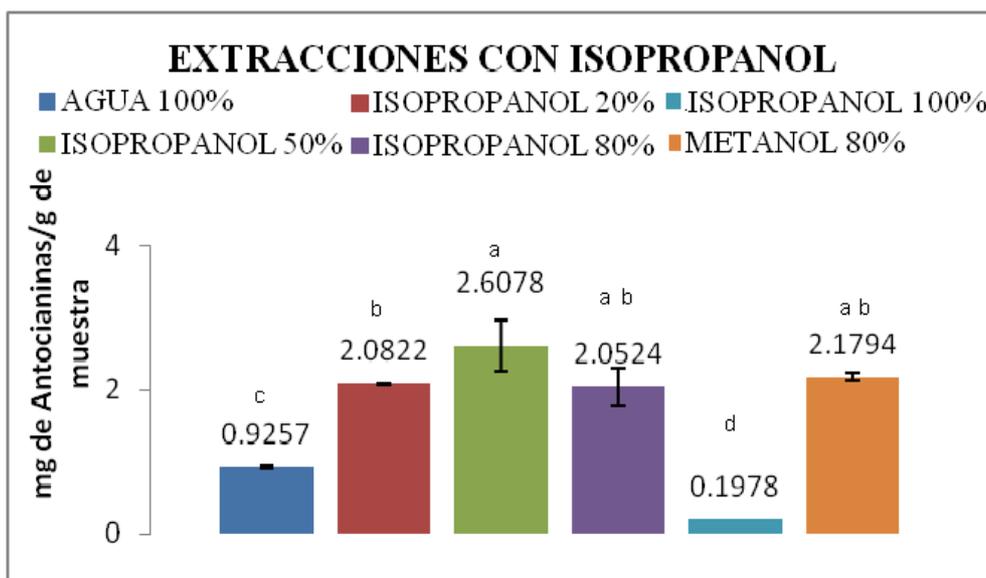
\* a, b, c y d son diferentes estadísticamente.

Gráfica 4. Extracciones con etanol a diferentes concentraciones



\* a, b, y c son diferentes estadísticamente.

Gráfica 5. Extracciones con acetona a diferentes concentraciones



\* a, b, c y d son diferentes estadísticamente.

Gráfica 6. Extracciones con isopropanol a diferentes concentraciones

De acuerdo al análisis estadístico realizado, se tiene que entre disolventes el agua es quien presenta diferencia estadística, siendo el que da un bajo rendimiento en las extracciones.

Con lo que respecta a las fracciones (Gráficas 4-6), se tiene que a mayor cantidad de agua la extracción no es eficiente presentando bajo rendimiento, así como también cuando el disolvente se encuentra al 100%, el máximo se alcanza cuando el disolvente se encuentra al 50% con respecto al agua y tiende a disminuir poco a poco cuando la cantidad de disolvente es mayor que el del agua. Sin embargo, no hay diferencias significativas, entre 50 y 80% en todos los casos.

Se ha encontrado que las extracciones de antocianinas en la pulpa de la uva son 20 % más efectivas con metanol que con etanol y 73% más efectivas que sólo con agua (Metivier y Clydesdale, 1980) Sin embargo, en este caso tanto con etanol y metanol no presentan diferencia significativa.

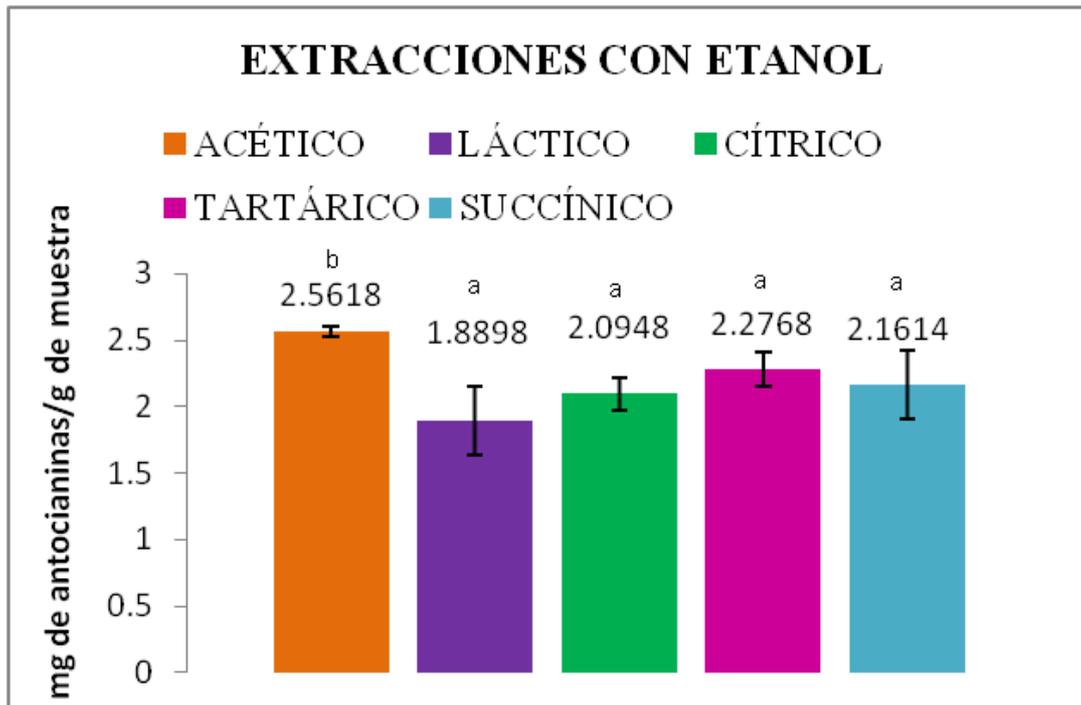
López et al, 2008, realizaron la extracción de antocianinas en 18 cepas de maíces que van del maíz blanco hasta el negro con etanol al 80% lo que encontraron fue que el contenido de antocianinas va del intervalo de 0.01mg a 8.60mg de antocianinas/g de muestra, mientras que en el maíz de este trabajo presenta un promedio del **2.5mg/g** encontrándose dentro del parámetro.

Tünde et al, 2008 realizaron un trabajo en residuos de uva con acetona como disolvente a 50, 70 y 100%, lo que encontraron fue que la mejor extracción se llevaba a cabo a 50% y esta disminuía cuando llegaba al 100% por lo que presenta la misma tendencia que en el presente trabajo, la cantidad de antocianinas que se extrajeron con 50% de acetona y 20° C fueron 0.74mg/g de muestra, en este caso el salvado de maíz a estas condiciones se lograron extraer 2.64mg/g de muestra, presentando una mayor cantidad de antocianinas que en la cáscara de uva. Lu y Foo, 2001 explican que en los extractos de antocianinas de acetona no se identifican, debido a que hay un cambio estructural de la molécula, formando piranoantocianinas a través de una oxidación mediada por la acetona.

De acuerdo a estos resultados obtenidos y con el fin de optimizar tiempo y costo de extracción se ha decidido usar etanol al 80% como disolvente a emplear en las siguientes extracciones por su baja toxicidad en alimentos y por su fácil evaporación y recuperación con respecto al agua.

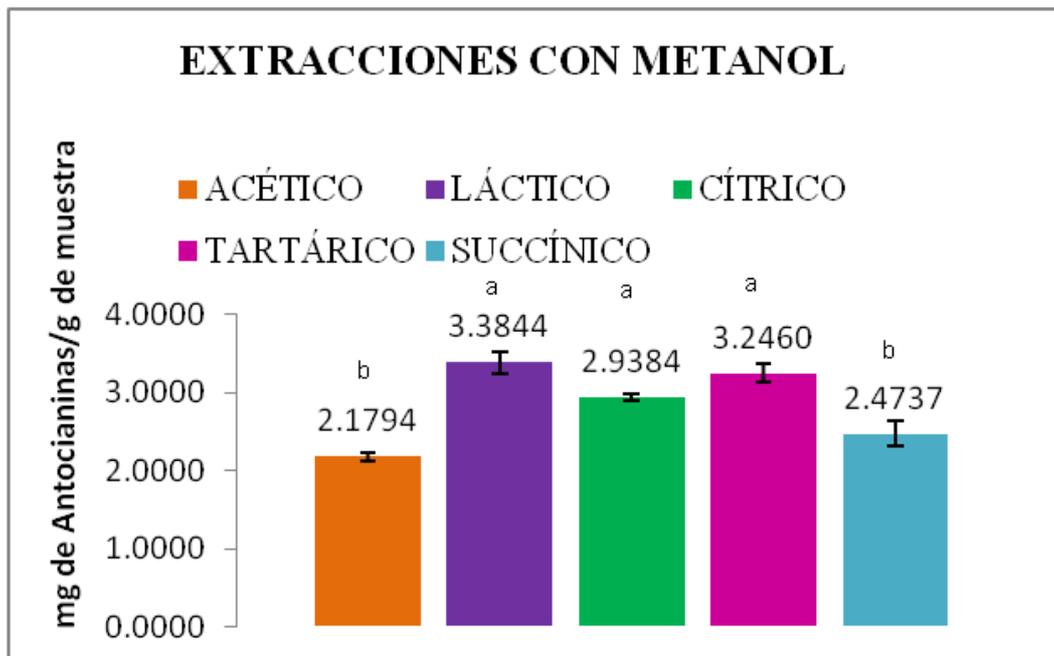
### *3.2.5 Extracciones con diferentes ácidos orgánicos*

A continuación se presentan los resultados de las extracciones con los diferentes ácidos orgánicos, estos se usaron con el fin de emplear ácidos naturales para darle un valor agregado al extracto; las extracciones se llevaron a cabo con los disolventes, etanol al 80% y como referencia metanol al 80% y agua, cada uno de ellos acidificados al 1%. Las antocianinas totales se han expresado como mg de antocianinas/g de muestra, al realizarse por triplicado sólo se presenta el promedio y la desviación estándar de cada tratamiento.



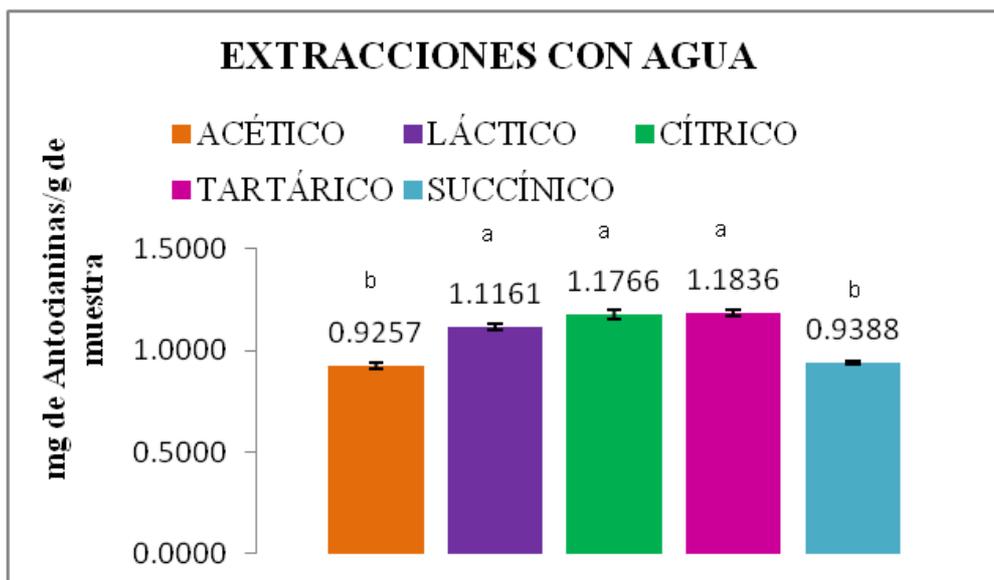
\* a y b son diferentes estadísticamente.

Gráfica 7. Extracciones con ácidos orgánicos en etanol



\* a y b son diferentes estadísticamente.

Gráfica 8. Extracciones con ácidos orgánicos en metanol



\* a y b son diferentes estadísticamente.

Gráfica 9. Extracciones con ácidos orgánicos en agua

De acuerdo al análisis de varianza se encontró diferencia significativa entre el ácido acético con los demás ácidos en todos los casos, en cambio, el succínico presentó diferencia significativa con el láctico, cítrico y tartárico cuando se extraen con metanol y agua pero no con etanol. Sin embargo, una vez más se encuentra diferencia entre la extracción con agua, dando los rendimientos más bajos.

Si bien se tiene que el pka de los ácidos láctico, cítrico y tartárico presentan valores de 3.86, 3.08 y 3.03 respectivamente, en cambio los del ácido acético y succínico son 4.75 y 4.20; los primeros han extraído mayor cantidad de antocianinas en los disolventes más polares como lo son el agua y metanol, mientras que en el etanol el que ha extraído mayor cantidad ha sido el acético que presenta un pka mayor a los demás, por lo que esto indica una relación directa entre la fuerza de disociación de los ácidos débiles con la polaridad de los disolventes.

Yang *et al*, 2007 en una investigación sobre extracción de antocianinas en un análisis factorial utilizando los ácidos cítrico y acético al 0,25; 0,50 y 1% (v/v) en medio etanólico y metanólico al 80, 90 y 100% (v/v) se encontró antocianinas entre 0,78 y 5,90 mg/g coronta, por lo que los valores encontrados en el presente trabajo se encuentra dentro del intervalo.

Para extracciones posteriores se hará uso del ácido láctico, ya que el uso de ácido acético deja residuos de olor y sabor característicos de éste y al emplearse a un alimento le conferirán características indeseables sensorialmente; en cuanto al ácido láctico permite una mejor aplicación y dispersión ya que se encuentra en forma líquida, su disponibilidad y costo son más accesibles en comparación a otros ácidos.

Sin embargo, el ácido a emplear tendrá que ser compatible con el alimento al que se desea aplicar, es decir si se trata de un lácteo el ácido láctico es una buena opción, si se usa en alguna bebida, el cítrico o tartárico será la opción dependiendo de la fruta de la que esté elaborada la bebida y así sucesivamente.

### 3.2.6 Cuantificación y comparación de Antocianinas métodos de pH diferencial y HPLC

Se cuantificó antocianinas a los extractos obtenidos anteriormente con los diferentes disolventes y ácidos orgánicos, por el método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), usando como estándar a la cianidina 3-glucósido, los resultados (Tabla 5) se expresan en mg de antocianinas/g de muestra y se hace una comparación de los diferentes métodos de cuantificación de antocianinas.

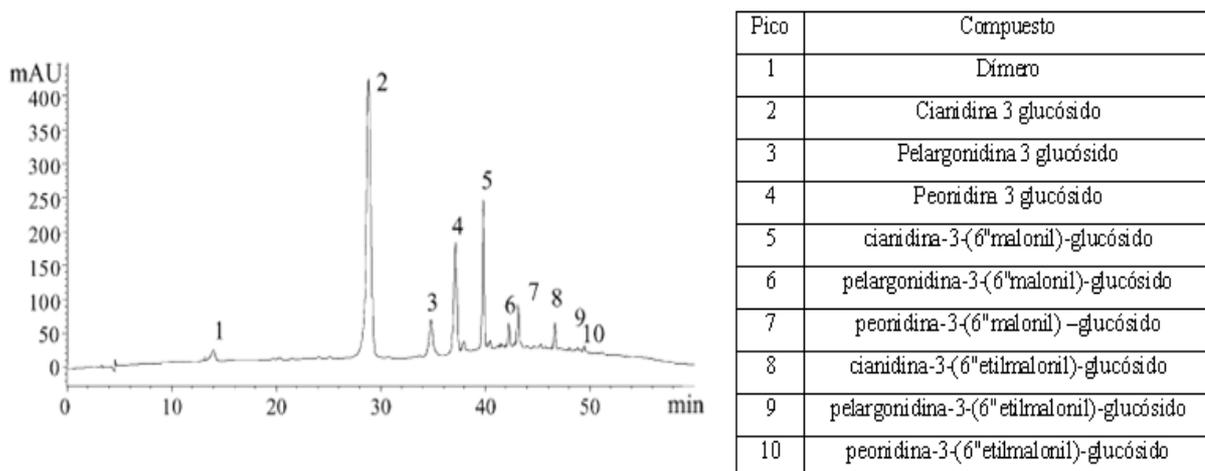
Tabla 5. Cuantificación de Antocianinas por HPLC y pH diferencial (mg de antocianinas/g de muestra)

Método Disolvente	HPLC	pH Diferencial	□
Etanol/Acético	2.5056	2.5618	0.0562
Metanol/Acético	2.4356	2.4803	0.0447
Acetona/Acético	1.5836	2.1123	0.5287
Isopropanol/Acético	1.0292	1.6110	0.5818
Etanol/Láctico	1.8043	1.8898	0.0855
Etanol/Cítrico	1.6584	2.0948	0.4364
Etanol/Tartárico	2.2518	2.2768	0.0250
Etanol/Succínico	2.0456	2.1614	0.1158

Se cuantificó antocianinas por el método de pH diferencial y por el método de HPLC, de acuerdo a los resultados de la tabla 5 y al análisis estadístico empleado indican que no existe diferencia estadística entre ambos métodos.

Sin embargo, la sensibilidad de cada método es diferente, encontrando que la cromatografía líquida detecta diferentes señales en un amplio intervalo de absorbancia, identificando las diferentes antocianinas presentes en un extracto con la ayuda de compuestos de referencia, mientras que para pH diferencial, permite cuantificar las antocianinas totales sin poder discriminar entre ellas y cuantificando su absorción espectral.

Para cuantificar los extractos obtenidos con disolventes y ácidos orgánicos se ha usado como estándar de referencia la cianidina 3-glucósido y para identificar el perfil de antocianinas presentes en los extractos de salvado, los cromatogramas obtenidos se han comparado con el de la Figura 7.



\* 1. Dímero formado por condensación directa entre un flavan-3-ol y cianidina 3-,5-diglucósido

Figura 7. Cromatograma HPLC a 520nm de extracto de olote de maíz. Escribano-Bailón *et al*, 2004

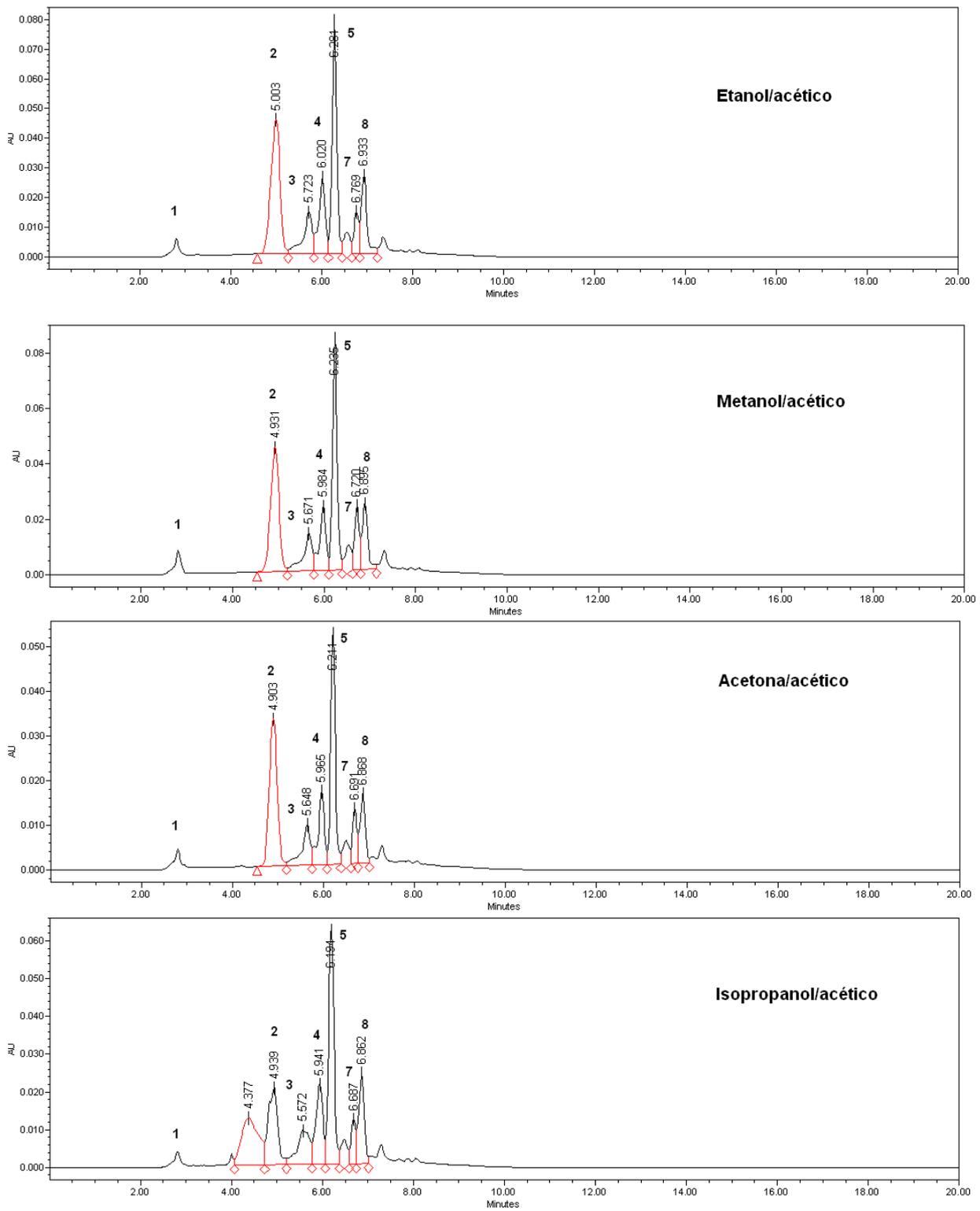


Figura 8. Cromatogramas HPLC extractos con disolventes

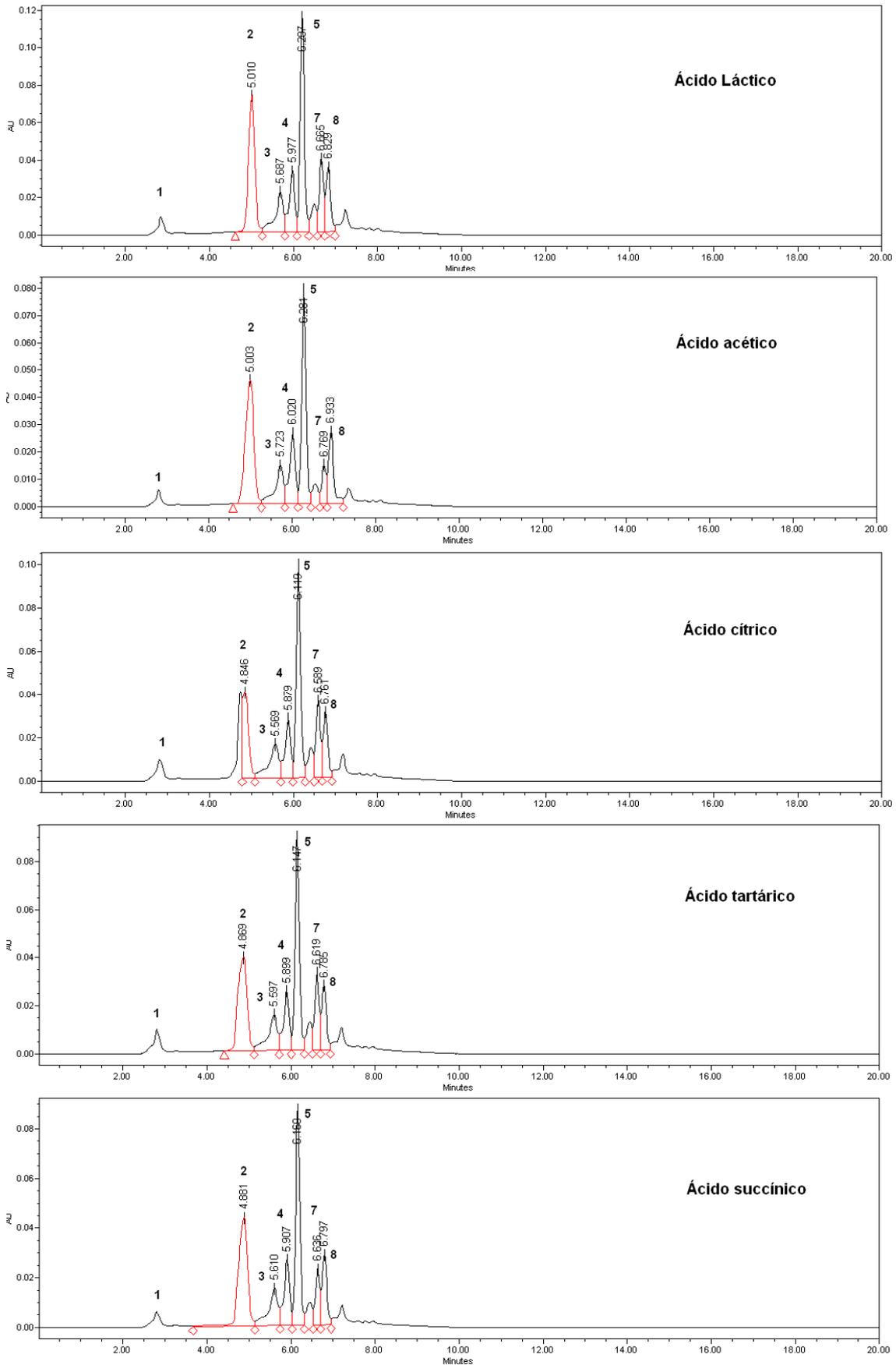


Figura 9. Cromatogramas HPLC extractos con ácidos orgánicos

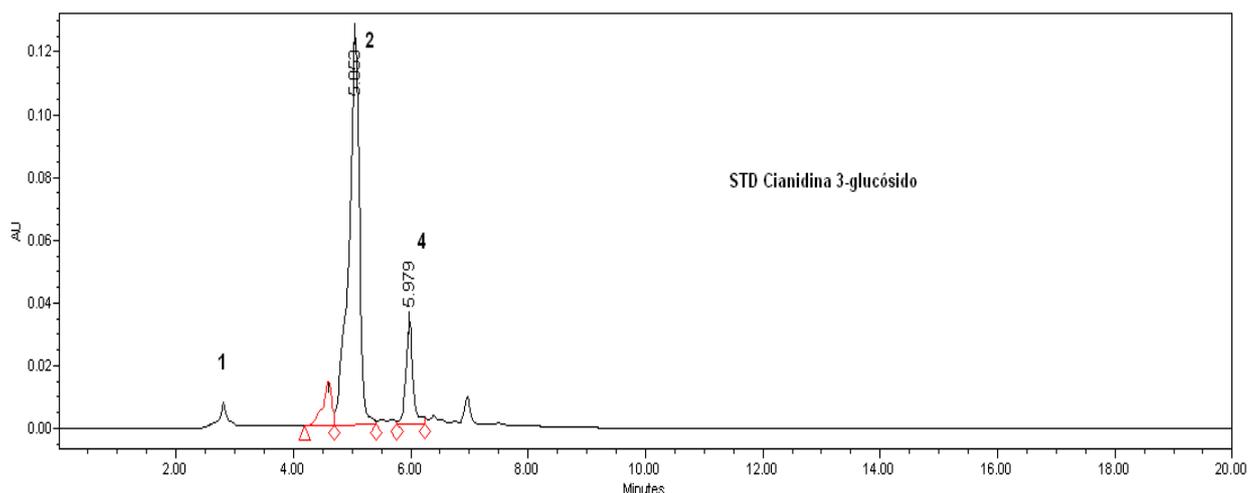


Figura 10. Cromatograma HPLC, estándar de cianidina-3-glucósido

Se presentan los cromatogramas en las Figuras 8 y 9, donde se muestran que los extractos obtenidos coinciden entre ellos, por lo que eso significa que el perfil de antocianinas y concentración es similar independientemente del disolvente y el ácido que se usan para su extracción. De acuerdo a la figura 7 y 10 que son cromatogramas de referencia y el estándar de cianidina-3-glucósido se encuentra que hay en mayor cantidad la cianidina-3-(6malonil)-glucósido, seguido de la cianidina-3-glucósido en cada uno de los extractos.

En un estudio realizado para caracterización de antocianinas de maíces, Cuevas et al, 2008 identificaron dos antocianinas mayoritarias en todas las variedades de maíz morado estudiadas, independientemente de su origen: cianidina-3-glucósido 42,5%, y cianidina-3-(6"malonil)-glucósido 30,7%. Las cuales fueron encontradas mayoritariamente en el presente trabajo, sin embargo en mayor proporción se encontró la cianidina-3-(6"malonil)-glucósido, de acuerdo a las señales obtenidas en los cromatogramas.

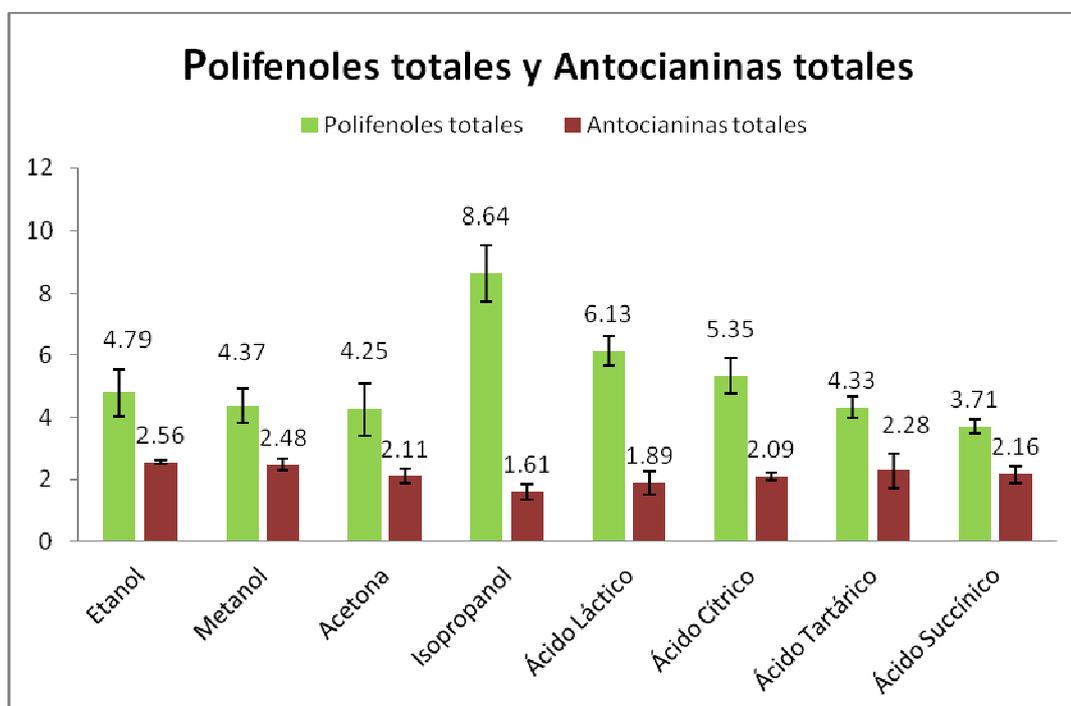
Hiromitsu et al, 2002 realizaron un estudio en maíz morado Peruano, se llevó a cabo análisis por HPLC, HSCCC, H y C NMR lo que arrojó los datos de que un 73.3% de compuestos encontrados son derivados de la cianidina, donde el 44.2% es la cianidina-3-glucósido y el 23.2% corresponde a la cinianidina 3-6-malonil-glucósico, el resto de los compuestos es el 9.3% de derivados de pelargonidina y el 17.5% son derivados de peonidina.

Escribano et al, 2004 realizaron un estudio y analizaron un maíz comercial y se encontró que en mayor proporción hay la cianidina-3-glucósido con 54.3% seguido de la peonidina 14.7% y la cianinidina-3-6-malonil-glucósido 11.6% de abundancia.

Se sabe que las antocianinas son más estables en cuanto mayor número de metoxilos tenga en el anillo fenólico así como la glucosilación y acilación de los azúcares; siendo más estables los diglucosidos que sus respectivos monoglucosidos. Por lo tanto el extracto obtenido del salvado de maíz del presente trabajo no es un colorante potencial, a menos que su aplicación sea en matrices ácidas; sin embargo el extracto tiene un alto potencial como antioxidante.

### 3.2.7 Cuantificación de polifenoles y relación con las antocianinas totales

Se realizó una medición de polifenoles totales a los extractos obtenidos con los diferentes disolventes y ácidos empleados; usando una curva patrón con ácido tánico y se hizo una comparación (Gráfica 10) y relación con las antocianinas extraídas.



\* Los polifenoles totales y antocianinas totales se presentan en mg/g de muestra

Gráfica 10. Comparación y relación entre polifenoles y antocianinas

Como se observa en la Gráfica 10, se tiene que con el isopropanol se obtiene en promedio una mayor extracción de polifenoles **8.6358mg/g**, al igual que al realizar las extracciones con etanol-ácido láctico **6.1297mg/g**, esto indica que el extracto obtenido se encuentra enriquecido con polifenoles de diversos tipos y se logra su obtención dependiendo de su naturaleza, su disponibilidad y su solubilidad en las diferentes condiciones. Por lo que se observa (Gráfica 10) las antocianinas extraídas en estas condiciones, van del 20 al 50% con respecto a los polifenoles.

Gorriti et al, 2009 presentaron en su estudio el contenido de fenoles totales en corontas de maíz morado que van desde 23.426mg/g con las condiciones de 25 °C y 30 minutos y 76.945mg/g para 90°C y 240 minutos. Sin embargo, el contenido de fenoles en este estudio es menor al mínimo, esto se puede deber principalmente a la muestra, ya que debido al método de preparación inicial, ésta presenta cierta cantidad de almidón, lo que disminuye el rendimiento de los demás compuestos. Así como también es importante realizar las extracciones a mayor temperatura y tiempo como lo indica la literatura.

López et al, 2008 realizaron un estudio sobre 18 variedades de maíces mexicanos y determinaron cantidad de compuestos fenólicos totales, libres y ligados. Sin embargo, para los fines de este estudio, se enfocará a los fenoles totales; el intervalo va desde los 0.17-34mg/g encontrando que el maíz morado está entre 4.65 - 34mg/g y el rojo presenta de 2.83 - 6.17mg/g lo cual indica que los resultados obtenidos en el presente trabajo están dentro de los parámetros.

El maíz (*Zea mays*) contiene más fenoles totales y mayor poder antioxidante que cereales como trigo, arroz y avena (Adom y Liu, 2002). El principal fenol es el ácido ferúlico, que representa alrededor de 85 % de los fenoles totales y se concentra en el pericarpio del grano en forma libre o esterificada a las heteroxilanas que constituyen la hemicelulosa de la pared celular (De la Parra et al, 2007).

### 3.3 ETAPA III

Con los resultados obtenidos en la etapa II, donde la extracción se llevará a cabo en una hora con extracción múltiple, la relación muestra disolvente es de 1:10, usando como disolvente etanol al 80% con ácido láctico al 1%, se realizó a mayor escala y se procedió a preparar colorantes líquidos y sólidos con tres vehículos diferentes.

#### 3.3.1 Rendimientos de escala preparativa

Se pesaron 500g de salvado de maíz y se realizó la extracción. Se cuantificó antocianinas totales por pH diferencial, se evaporó el disolvente y se procedió a liofilizar, hasta obtener el extracto rico en antocianinas, en la tabla 6 se muestran los datos del rendimiento obtenido.

Tabla 6. Rendimiento de escala preparativa

Componente	Rendimiento por Kg de maíz
Salvado	25g
Extracto liofilizado	2.68g
Antocianinas	14.74mg

De acuerdo a un proceso industrial para la obtención de harina cruda de maíz, se tiene que el 25% es de cáscara y germen el cual corresponde al salvado, siendo de igual forma lo que se obtuvo de manera manual. (Tecnologías limpias, 2004)

Sin embargo, Salinas et al, 2005 obtuvieron como rendimientos de la fracción pericarpio- capa de aleurona de cuatro variedades de maíces un porcentaje entre 40.2 y 55.1% esta diferencia se puede deber a que la obtención de estas fracciones fueron por medio de una perladora de cebada, la cual garantiza una mayor separación de las capas y eliminación del almidón.

En cuanto a los extractos puros para su aplicación en yogurt, se cuantificó de 1352mg a 2594mg/ kg de muestra, lo cual está muy lejos de lo obtenido en el presente trabajo. Esto se puede deber al tipo de maíz, maduración así como el clima en el que ha crecido

### 3.3.2 Medición de color a colorante en polvo y líquido

A continuación se presentan los resultados (tabla 7) de color obtenidos de los colorantes líquidos y sólidos elaborados con el extracto de antocianinas; el cual tiene una consistencia viscosa, después de ser liofilizado éste se encuentra en forma de pasta, por lo cual es necesario emplear compuestos en polvo como vehículos, los cuales fueron amaranto, dextrina e inulina.

Para la elaboración de los colorantes sólidos, se pesó la cantidad de extracto liofilizado para tener la cantidad de **4.5mg** de antocianinas mientras que para los colorantes líquidos, se pesó la cantidad de colorante sólido que aportara **1.1mg** de antocianinas.

Tabla 7. Medición de color en colorantes

	Concentración De antocianinas (%)		L*(D65)	DS	a*(D65)	DS	b*(D65)	DS
<b>Líquidos</b>	<b>0.002</b>	Amaranto	101.29	0.32	2.15	0.01	0.18	0.45
	0.002	Dextrina	100.72	0.35	2.77	0.32	1.06	0.04
	0.002	Inulina	101.15	0.18	2.87	0.03	0.15	0.02
<b>Sólidos</b>	<b>0.06</b>	Amaranto	51.46	0.23	32.95	0.23	6.15	0.08
	0.06	Dextrina	54.33	1.02	30.35	0.28	10.76	0.51
	0.06	Inulina	65.87	0.31	34.25	0.32	1.85	0.22

Es importante destacar que no se realizarán comparaciones de los resultados entre colorantes líquidos y sólidos ya que no presentan la misma concentración de antocianinas, pues los colorantes líquidos están hechos a partir del sólido. Sin embargo entre ellos si tienen la misma concentración, cabe aclarar que para poder obtener un colorante sólido manejable, el cual no se debe apelmazar se utilizó diferentes proporciones de los vehículos, ya que cada uno de ellos tenía diferentes características.

Se observa en la tabla 7, que para los colorantes líquidos, los tres presentan la misma luminosidad, para el parámetro a\* todos tienden al positivo que es el **rojo**, y no se encontró diferencia significativa entre ambos parámetros. Para el parámetro b\* también se muestra el la región positiva, que corresponde al **amarillo** sin embargo, estos valores son más bajos con respecto al rojo,

cabe mencionar que en dextrina presenta diferencia estadística con respecto a las otras dos muestras, mostrando el valor más alto, esto se puede deber a que la dextrina que se utilizó para la elaboración del colorante presentaba color amarillo que es lo que detectó el colorímetro, por el contrario el amaranto también presentaba una tonalidad ligeramente amarilla, pero en este caso no fue percibida.

Sería importante realizar las mediciones de colorantes líquidos hechos a partir del extracto liofilizado, ya que las tonalidades que se han obtenido, no permiten ser aplicados a algún alimento porque no se detecta coloración, por la baja concentración de antocianinas.

Para los colorantes sólidos se tiene que la luminosidad del colorante de inulina es diferente estadísticamente, esto se debe a que las características de la inulina son distintas a la de las otras dos, presentando un mayor brillo en el colorante, para los parámetros que tienden al color rojo son iguales, en cambio para el parámetro que tiende al amarillo todos son diferentes estadísticamente, siendo la dextrina quien presenta el valor más alto debido al color inicial del vehículo.

Es importante destacar que para hacer usos de estos vehículos se debe tomar en cuenta para qué alimento serán utilizados, ya que dependiendo los componentes de la matriz deberá ser compatible, ya que tanto la inulina como la dextrina son solubles en agua, en cambio el amaranto presenta partículas que no son solubles.

Otro punto a destacar es el costo y volumen del vehículo, ya que para realizar el mismo colorante se utiliza menos cantidad de amaranto, en proporción 1:2, mientras que para dextrina es 1:7 e inulina es 1:20, siendo este último el que tiende a apelmazarse con mayor facilidad por ser higroscópico, en cambio el amaranto puede durar mucho más tiempo, sin que este deje de ser un polvo.

### 3.4 ETAPA IV

Obteniendo el extracto liofilizado y los colorantes con vehículos, se procedió a la aplicación en diferentes matrices alimenticias.

#### 3.4.1 Bebidas

Para elaboración de las bebidas se empleó directamente del extracto liofilizado del salvado de maíz, al igual que un extracto de hojas de maíz obtenido en el laboratorio, se prepararon soluciones de estándares de Altecsa a la misma fuerza aparente (determinada espectrofotométricamente con anterioridad en el laboratorio DNP-Altecsa), posteriormente se igualaron visualmente las muestras de salvado y hojas de maíz.

Los espectros (Figuras 11-13) de las bebidas elaboradas con los extractos de salvado, y como comparativos el de hojas de maíz elaborado en el laboratorio y black carrot del grupo Altecsa, se presentan con el promedio de ambas pasteurizaciones para compararlos con el de su correspondiente testigo sin pasteurizar; así como su  $L^*a^*b^*$ .

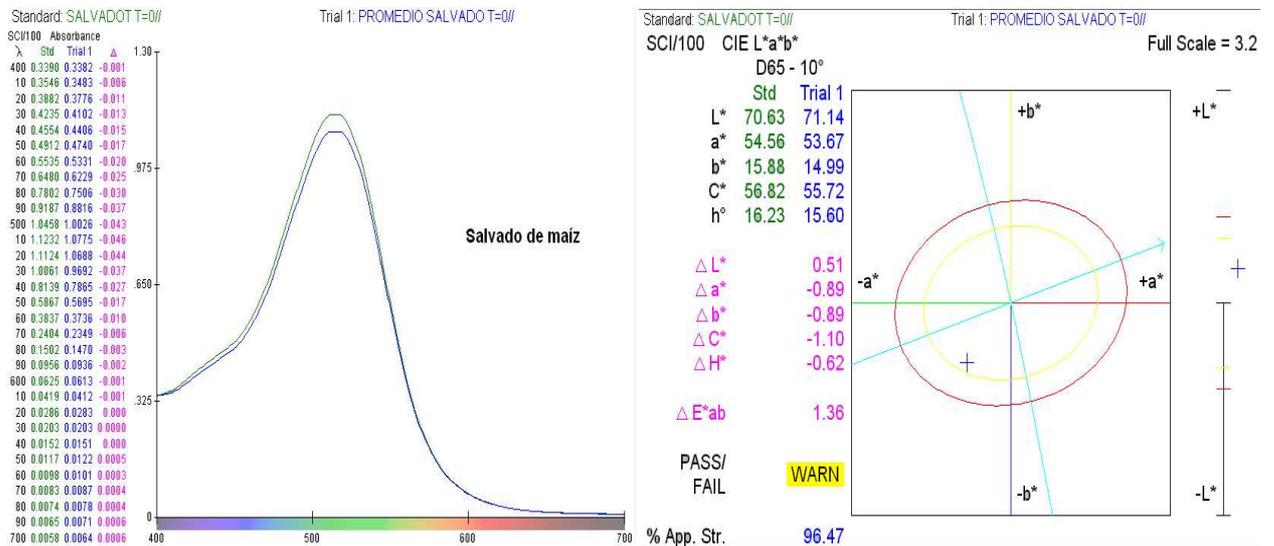


Figura 11. Espectros de bebidas con colorante de salvado de maíz

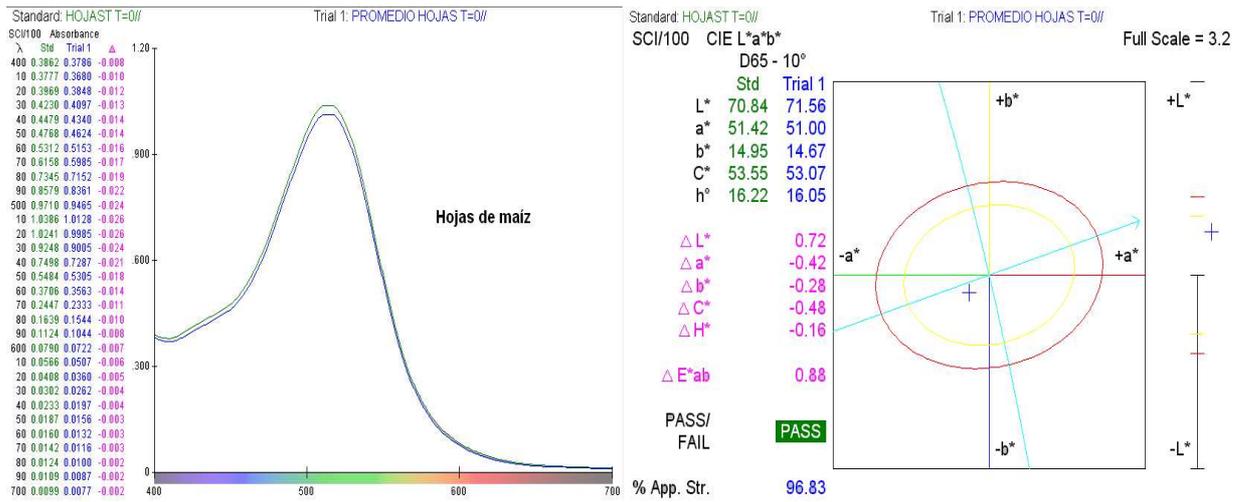


Figura 12. Espectros de bebidas con colorante de hojas de maíz

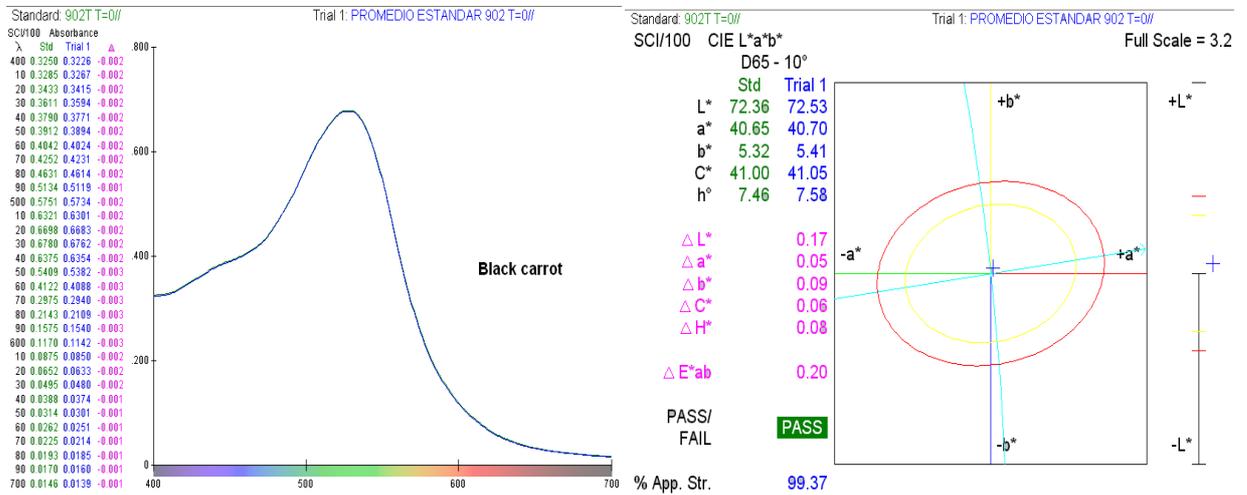
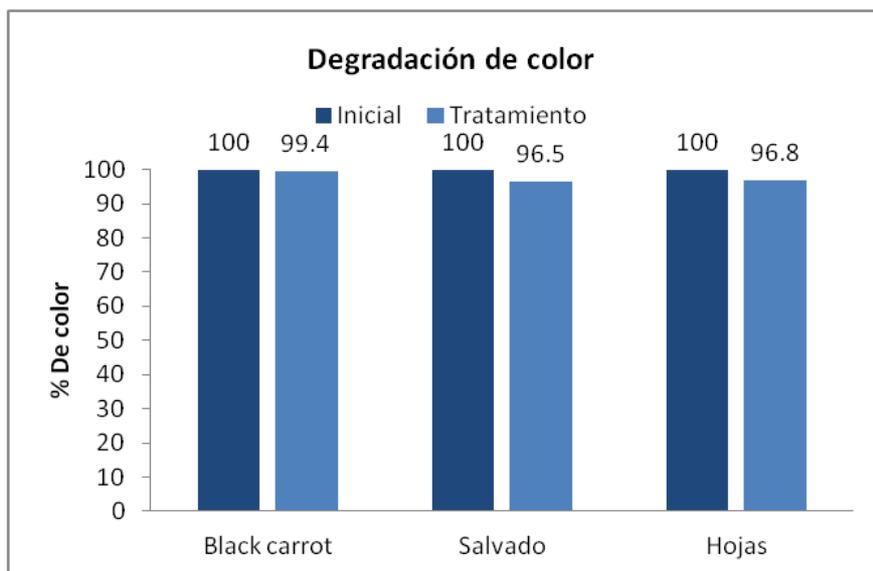


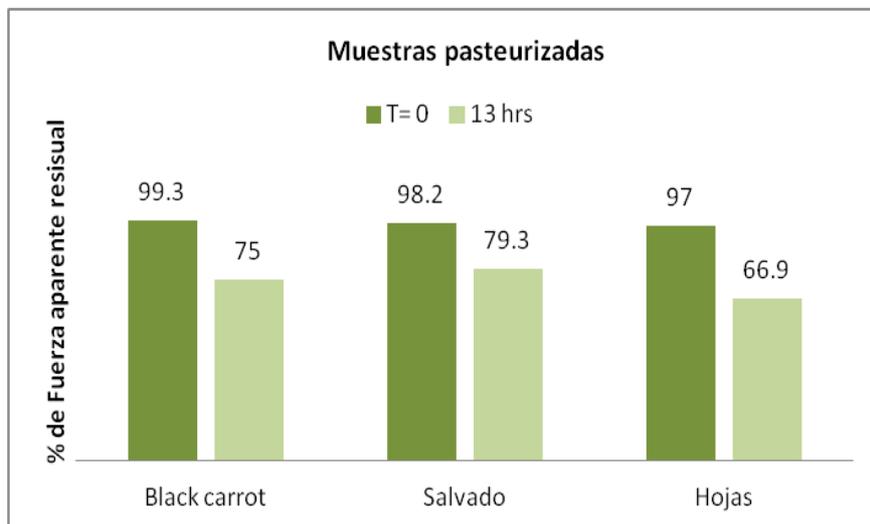
Figura 13. Espectros de bebidas con colorante de Black carrot (Altecsa)



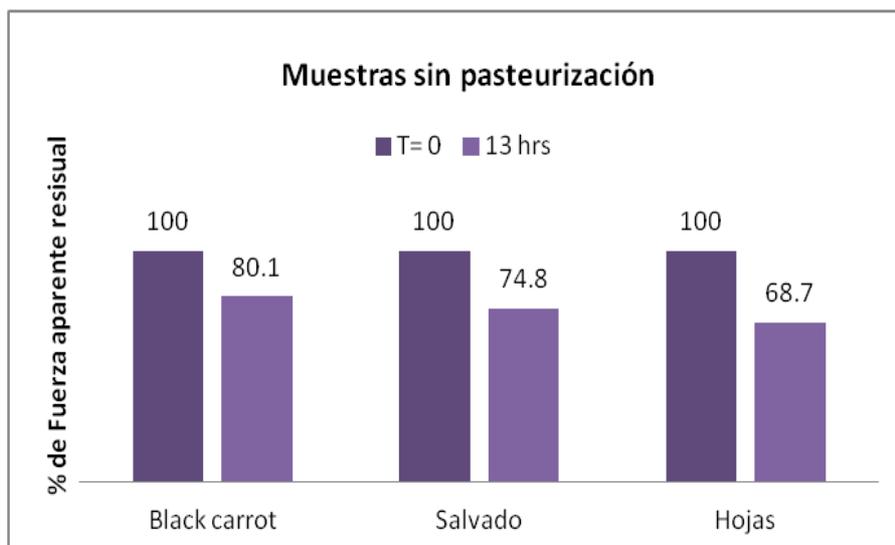
Gráfica 11. Degradación de color de bebidas después de tratamiento

De acuerdo a lo que se tiene en las figuras 11-13, se puede observar en los espectros la degradación del color fue mínima para todas las muestras, de tal forma que el cambio en la tonalidad no fue significativo y por lo tanto el equipo no encuentra diferencia entre las tonalidades de las muestras una vez pasteurizadas con su respectivo testigo sin pasteurizar. Lo anterior es más evidente en la gráfica 11.

Con base en el porcentaje de la fuerza aparente inicial, que es el que depende de la longitud de onda que refleja, y la onda del pigmento que colorea la superficie de la bebida se construyeron los gráficos 12 y 13 de % Fuerza aparente residual.

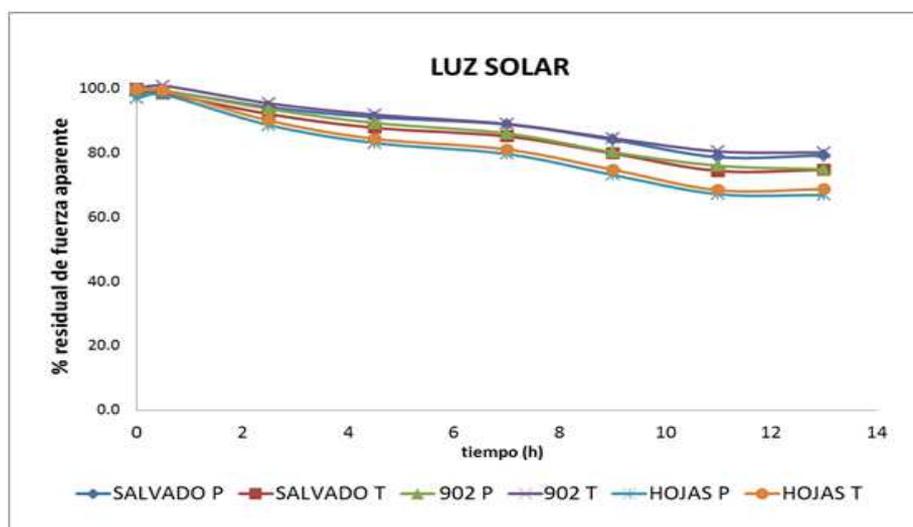


Gráfica 12. % de Fuerza aparente residual en muestras pasteurizadas



Gráfica 13. % de Fuerza aparente residual en muestras sin pasteurizar

Las muestras envasadas se sometieron a iluminación solar y se evaluaron espectrofotométricamente a distintos tiempos para conocer que tan estables son.



Gráfica 14. Degradación de color con exposición a luz solar

Se encontró que para la elaboración de bebidas, se necesita 3 veces más de extracto de salvado con relación al estándar de black carrot. Esto ya implica una desventaja sobre el colorante en estudio, debido a que la cantidad necesaria para poder igualar una bebida comercial será alta, lo que implica un alto costo en materias primas.

De acuerdo a las gráficas 11, se observa que el % de color que se perdió en la bebida después del tratamiento es menor al 5%, mientras que en las gráficas 12 y 13 se tiene que los colorantes en las bebidas presentan la misma tendencia que el que no fue sometido a pasteurización. Por lo que esto indica que no existe una muestra que presente una disminución significativa en la degradación del color, siendo esto favorable ya que se obtuvo un colorante que puede ser sometido a altas temperaturas como es la pasteurización, sin presentar una degradación aparente.

Se sometió a la irradiación solar la muestra testigo y una muestra pasteurizada, fueron evaluadas espectrofotométricamente a varios tiempos. La curva de degradación (gráfica 14) se puede observar que para todos los casos es muy similar, lo que denota una estabilidad igual en las muestras.

Elizondo et al, 2004 realizaron un trabajo donde determinaron la estabilidad de un colorante de maíz morado mediante la aplicación en bebidas hidratantes, lo que encontraron fue que en 15 días el color se redujo sólo un 20% también se encontró que no hubo diferencia significativa tanto a temperatura ambiente como a 10°C. Sin embargo, si estás no tenían ácido cítrico el color se degrada hasta el 70%. Por lo que los resultados obtenidos son similares a lo que se obtuvo en el presente trabajo. Es importante tomar en cuenta que la matriz en la que se debe emplear el colorante debe ser un medio ácido.

### 3.4.2 Yogurt

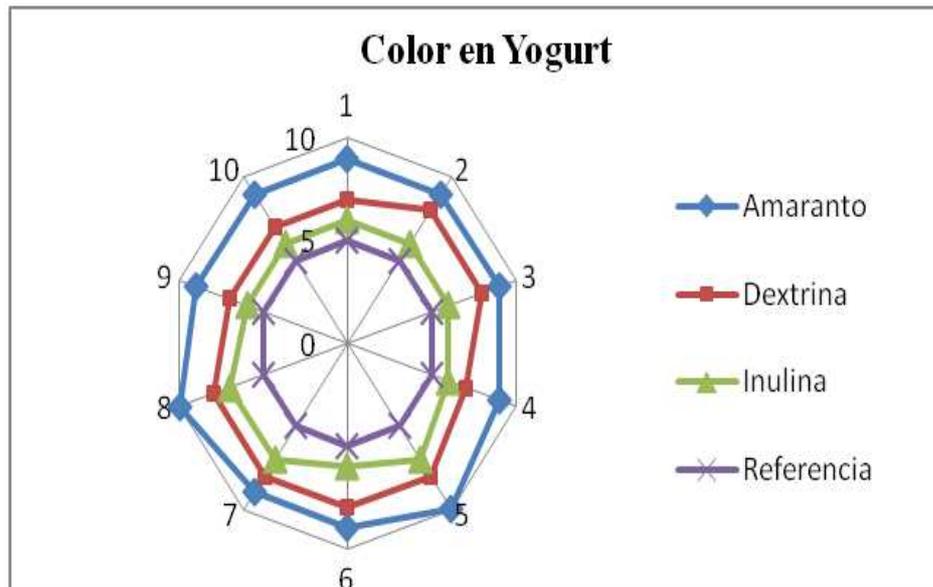
Los colorantes sólidos se aplicaron en yogurt natural (figura 14), pesando la misma cantidad y dispersándolo hasta obtener un color homogéneo. Se procedió a una evaluación visual con consumidores, tomando como referencia un yogurt de fresa comercial (figura 15).



Figura 14. Yogurt con inulina, amaranto y dextrina respectivamente.



Figura 15. Yogurt comercial



Gráfica 15. Percepción de color en consumidores

De acuerdo al análisis estadístico realizado, se encontró que si hay diferencia significativa entre cada uno de los colorantes con respecto a lo que observaron los consumidores, cabe señalar que entre jueces no hubo diferencia significativa, lo cual indica que la prueba tiene validez.

Wallace et al, 2008 realizaron un estudio, donde determinaron el color y estabilidad en yogurt con antocianinas provenientes de berberis boliviana. Y se encontró que el color es muy estable, siendo similar a colorantes sintéticos de yogurt de blueberry, así como al purple carrot el cual es un colorante natural. También se encontró que después de dos semanas no hubo pérdida de polifenoles, con lo cual se obtiene un yogurt rico en grupos fenólicos.

Si lo que se busca es igualar el color del yogurt comercial, el colorante con inulina es el que presenta un tono similar. Sin embargo, se podría cambiar la concentración de cada uno de ellos, cabe señalar que en el mercado existen diferentes marcas y diferentes tonalidades, lo cual permite implementar cada uno de ellos de acuerdo a las especificaciones del producto y necesidades del consumidor.

Otro aspecto a tomar en cuenta es que cada uno de los colorantes pudo integrarse homogéneamente en el yogurt, perdurando el color debido a que este es un alimento ácido y de consumo rápido.

### 3.4.3 Tortillas

Para la elaboración de tortillas, fue necesario aplicar los colorantes sólidos a la harina de maíz nixtamalizada (figura 16) para homogeneizar, posteriormente se hidrató la harina y se elaboró la masa.



Figura 16. Harinas de maíz nixtamalizado con colorantes

En la figura 16 se observan las tres harinas de maíz nixtamalizado, cada una con un colorante diferente; al hidratar las harinas y hacer la masa, se observó que los colorantes se atenuaron hasta desaparecer, esto debido a que es un medio alcalino, lo cual provocaba que las antocianinas estén en forma de chalcona, las cuales son incoloras e inestables.

Es por eso que no se pudo realizar la elaboración de tortillas, otra causa puede ser que la harina empleada tenga una gran cantidad de hidróxido de calcio, por lo que se probaron los colorantes directamente con la masa, la cual ya tiene una menor cantidad de cal.



Figura 17. Tortillas elaboradas a partir de masa comercial.

En este caso el color en la masa fue muy tenue, después de realizar las tortillas y cocerlas el color incremento ligeramente, sin embargo después de 20 min de su elaboración el color desapareció totalmente, (figura 17) tomando en cuenta que a pesar de que las tortillas son un alimento de consumo rápido, el color no perdura el tiempo necesario desde que son elaboradas hasta que llega a la mesa del consumidor. Es por eso que se ha descalificado el uso de los colorantes obtenidos en este producto.

## CONCLUSIONES

Se logró obtener el salvado de maíz el cual fue la fuente de obtención de antocianinas, se redujo el tiempo a *1 hora* con extracción múltiple, también se disminuyó la cantidad de disolvente para la extracción de antocianinas, se comprobó que a diferentes concentraciones de disolventes los rendimientos son variables, donde al 100% se presentan los más bajos y los mejores son al 50 y 80% sin mostrar diferencia significativa. Sin embargo, la concentración de disolvente para obtener el mejor rendimiento y fácil recuperación de estos fue, *80% de etanol y 20% de agua*.

Se comprobó que pueden ser usados diferentes ácidos orgánicos, siendo importante tomar en cuenta que para obtener altos rendimientos es necesario combinar el pka del ácido en cuestión con la polaridad del disolvente, es decir que a mayor fuerza de disociación se deberá emplear un disolvente con mayor polaridad. Sin embargo, se debe usar el ácido más adecuado dependiendo de la naturaleza de cada alimento.

Se obtuvo un extracto rico en *cianidina-3-glucósido* y *cianidina-3-(6malonil)-glucósido* así como en polifenoles, dando un gran aporte de compuestos antioxidantes.

Con respecto al rendimiento, se obtuvo un 2.68% de extracto, mientras que de antocianinas 14.74mg/kg de maíz el cual es bajo comparado con otras fuentes de antocianinas.

El uso de los vehículos es factible para poder mantener a las antocianinas en mejores condiciones y su fácil aplicación, puesto que el extracto obtenido se presenta en forma de pasta; el *amaranto* es el vehículo que necesita menor cantidad de aplicación al extracto para obtener un colorante con mejor manejabilidad y homogeneización del color, así como mantiene el colorante por mucho más tiempo libre de humedad. Sin embargo no se puede usar en alimentos líquidos ya que no se logra solubilizar en su totalidad.

Se logró la aplicación de los colorantes sólidos y del extracto en alimentos que presentan un *pH ácido*, como las bebidas y el yogurt, dando un color homogéneo y estable, pudiendo obtener diferentes tonalidades con diferentes

concentraciones del colorante, sin embargo es necesario emplear gran cantidad del extracto para obtener una bebida similar a la comercial, lo cual genera un alto costo de materias primas, pero se comprobó que es *estable* al ser sometido a altas temperaturas en un corto tiempo como es la *pasteurización*.

En el caso de las *tortillas* no se logró emplear el colorante, debido al pH alcalino de la masa/harina para su elaboración.

## RECOMENDACIONES

Es importante señalar que por el método de obtención del salvado, este acarrea gran cantidad de azúcares que pueden interferir en la extracción de las antocianinas, pero éstas también fungen como soporte en los colorantes, sería importante que se realizara un tratamiento enzimático para poder disminuir la cantidad de azúcares.

Otro aspecto importante son los residuos del salvado que se ha usado, ya que después del tratamiento de extracción, sigue persistiendo coloración, lo que indica que aún presenta antocianinas, las cuales deben ser extraídas con otro tratamiento enzimático para poder aprovechar la fuente.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Adom, K. K., and R. H. Liu. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6182–6187.
2. Agropanorama, 2012. disponible en:  
<http://www.agropanorama.com/news/Produccion-Mundial-de-Maiz.htm>  
Consultada el 28 de Febrero del 2012
3. Bakan, B., A. C. Bily, D. Melcion, B. Cahagnier, C. Regnault- Roger, B. J. R. Philogene, and D. Richard-Molard. (2003). Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2826-2831.
4. Barber, S.A. (1979). Corn residue management and soil organic matter. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71: 625627.
5. Bily, A. C.; Burt, A. J.; Ramputh, A.; Livesey, J.; Regnault-Roger, C.; Philog\_ene, B. R.; Arnason, J. T. (2004) HPLC-PAD-APCI/MS assay of phenylpropanoids in cereals. *Phytochemical. Analylis Journal*, 15: 9–15.
6. Bonfíl Guillermo, Marielle (coords), (2007). Sin maíz no hay país, *Arqueología Mexicana*, 38: 11
7. Botanical-online (1999). <http://www.botanical-online.com/salvado.htm>  
Consultada el 25 de Septiembre del 2012.
8. Breakey J, Reilly C, Connell H. (2002), *The role of additives and chemicals in Behavioral, learning, activity, and sleep problems in children*. In: branen AI, Davidson PM. Food additives. New York : Marcel Dekker Inc, p 87-88
9. Castañeda- Ovando A, Pacheco Hernández L, Paez Hernández E, Rodríguez JA, Galan Vidal CA. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 113:859-871
10. CEFPE. (05/2011). Análisis mensual de productos básicos, disponible en <http://www.cefp.gob.mx/publicaciones> , Consultada el 28 de febrero del 2012.
11. Cevallos-CasasL Ba, Cisneros-Zeballos L. (2004); Stability of Anthocyanin based. Aqueous Extract of Andean Purple Corn and Red Fleshed Sweet Potato Compared to Synthetic and Natural Colorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 86:69-77.
12. CIMMYT, 2009. disponible en:  
<http://apps.cimmyt.org/spanish/wps/mexico/mexicocimmyt.ht>, Consultada el 28 de Febrero del 2012.

13. Coultate TP. (1984). Food: The chemistry of its components. Burlington House, London: *The Royal Society of Chemistry*. p.113.
14. Cuevas Montilla E, Antezana A, Winterhalter P. (2008). *Análisis y caracterización de maíz (Zea mays L.)* Boliviano. Memorias, Red-Alfa Lagrotech, Comunidad Europea, Cartagena.
15. De la Parra, C, S. O. Serna Saldívar, and L. R. Hai. (2007). Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 4177–4183.
16. Del Pozo-Insfran, D. Brenes, C. H., Serna, S., y Talcott, S. T. (2006). *Polyphenolic and antioxidant content of White and blue corn (Zea Mays L.) products*. Food Research International, 39(6): 696-703.
17. Elizondo Cárdenas M., Urtecho Alvarado K. (2004). *Evaluación de los colorantes extraídos del maíz morado (Zea mays) Para la elaboración de bebidas hidratantes*. Universidad Earth, Guácimo, costa Rica.
18. Escribano Bailón MT, Beulga-Santos C, Rivas Gonzalo JC. (2004); Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography A*. 1054:129-141.
19. FAO. (1993). El maíz en la nutrición humana. Colección FAO: Alimentación y Nutrición, disponible en: <http://www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s00.htm>, Consultada el 20 de Febrero del 2012.
20. Gallardo, C., L. Jiménez, and M-T. García-Conesa. (2006). Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 99: 455-463.
21. Garzon GA, Wrolstad RE. (2002). Comparison of the Stability of Pelargonidin-based Anthocyanins in Strawberry Juice and Concentrate. *Journal Food Science and Technology*, 67(4):1288-1299.
22. Giusti M.M, Wrosltad RE. (2001). *Characterizacion and measurements of anthocyanins by UV-VIS spectroscopy*. New York: John Wiley y Sons. In Current protocols in Food Analitical Chemistry, p.13,
23. Gorriti Gutierrez A, Arroyo Acevedo J, Negron Ballarte L, Jurado Teixeira B, Purizaca Llajaruna H, Santiago Aquise LL, Taype Espinoza E, Quispé Jacobo F. (2009) *Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en corontas de maíz morado (Zea mays L.) Método de extracción*. Boletín latinoamericano y del Caribe en Plantas Medicinales y Aromáticas, 8(6): 509-518.
24. Hallagan JB. (1991). The Use of Certified Food Color Additives in the United States. *Cereal Food World*.36:945-948.

25. Heredia F.J. (2009). Apunte del curso *El color: fundamentos y aplicaciones* dictado en UNS Bahía Blanca,
26. Hiromitsu Aoki, N.Kuze, Y.Kato, (2002) Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays* L.) *Foods and Food Ingredients Journal*. Jpn, 199: 41
27. Hoshino, T., Matsumoto, U., & Goto, T. (1981). Self-association of some anthocyanins in neutral aqueous solution. *Phytochemistry*, 20: 1971–1976.
28. Huck P, Wilkes MC. (1996) *Beverage Natural Colors, Chemistry and application*, In: International Congress and Symposium on Natural Colorants, Puerto de Acapulco. México: Asociación de especialistas en colorantes y pigmentos naturales AC, p.11
29. Hutchings JH. (1999). *Food Color and Appearance*. 2nd ed. Gaithersburg, Md.:Aspen Publishers, Inc.
30. Jiménez Carla del Carpio, Carlos Serrano Flores, Monica Giusti. (2008). *Caracterización de antocianinas en los frutos de Lechler Berberis boliviana*. Rev. Sociedad Química Perú 75 (1).
31. Jing and M.M. Giusti. (2007). Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays* L.) Color Extract. *Journal of Food Science*, 72: 363-368
32. Jurd L. (1972) *Some advances in the chemistry of anthocyanin-type pigments*. In: Chichester CO, Editor. *The Chemistry of Plant Pigments*. New York: Academic Press, p. 123-142.
33. Kim, D. O., O. K. Chun, Y. J. Kim, H. Y. Moon, and C. Y. Lee. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (22): 6509- 6515.
34. Kong, J. Chia L.S. Goh, N. K. Chia T. F., Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64: 923-933.
35. Kulp Karel, Ponte, Joseph G. Jr. (2000) Eds. *Handbook of cereal Science and Technology* 2a edición Marcel Dekker, p.p. 31-81
36. Kuskoski, EM, Vega JM, RíosJJ, Fett R, Troncoso AM y Asuero AG. (2003) Characterization of anthocyanins from the fruits of baguacu. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18): 5450-5454.
37. Lauro GJ. (1991) A primer on Natural Colors. *Journal American Association Clinical Chemistry*, 36(11):949-953.
38. López Martínez Leticia. Oliart- Ros Ros M, Valerio-Alfaro Gerardo, Chen-Hsien Lee (2008). Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *International Journal of Food Science and Technology*. 42: 1187-1192

39. Lu, Y., and Foo, L. Y. (2001) unusual anthocyanin reactions with acetone leading to pyranoanthocyanin formation. *Tetrahedron Letters*, 42: 1371-1373.
40. Madene, A., J. Scher, and S. Desobry. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - a review. *International Journal of Food Science and Technology* 4(1): 1-21, 2006.
41. Martinez, S. (2002). *Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. 17. Universidad de León, España.
42. Matthaus B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 3444-3452
43. McCann D, Barrett A, Cooper A, Crumpler D, Dalen L, Grimshaw K.( 2007). Food Additives and Hyperactive Behaviour in 3-Year-old and 8/9-Year-old Children in the Community: A Randomised, Double-Blinded, Placebo-controlled Trial. *The Lancet*.370 (9598):1560-1567.
44. Metivier. P. Francis F.J. and Clydesdale, F. M. (1980) Solvent Extraction of anthocyanins from wine pomace. *Journal of food Science and Technology*, 45 (4)
45. New Jersey Department of Health, 2012. Hojas de seguridad. Consultada el 23 de abril del 2012 disponible en <http://www.nj.gov/health/eoh/rtkweb/>
46. Olaya CM, Castaño MP, Garzón GA. (2008). *Effect of Temperature and Water Activity on the Stability of Microencapsulated Anthocyanins Extracted From Andes Berry (Rubus glaucus) and Tamarillo (Solanum betaceum)*. Observations not published.
47. Parras Huertas, Ricardo Adolfo. (2010).Microencapsulación de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía. Medellín*, 63(2): 5669-5684.
48. Pedrola, I. E. (2005). *Polifenoles y sus propiedades antioxidantes*. Madrid, España.
49. Poesi-Langston MS, Wrolstad RE. (1981). Color Degradation in an Ascorbic Acid-Anthocyanin-Flavanol Model System. *Journal. Food Science and Technology*. 46(4):1218-1222, 1236.
50. Rein M, (2005). *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*. Helsinki: University of Helsinki. Pp. 10-14
51. Rodríguez- Saona, L. y Wrolstad RE (2001). *Extraction, isolation and purification of Anthocyanins*. In "Currents Protocols in Food analytic chemistry". John Wiley and Sons. Pp.1
52. Salinas M. Y., Soto, M. H. Martínez- Bustos, F., González (2005). *Extracción y uso de pigmentos del grano de maíz (Zea Mays L.) como colorantes del yogur*.

- Laboratorio de Maíz INIFAP Depto de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma de Chapingo.
53. Salinas, M. Y. J. J. López R., B. G. González F., y G. Vázquez C. (2007). Compuestos fenólicos del grano de maíz y su relación con el oscurecimiento de masa y tortilla. *Agrociencia* 41: 295-305.
  54. Sandoval A.A, Rodríguez S.E, Ayala A.A, (2004). Encapsulación de aditivos para la industria de alimentos. *Ingeniería y Competitividad, Revista Científica y tecnológica*: 5,2.
  55. Sandstead, H.H., Munoz, J.M., Jacob, R.A., Kelvay, L.M., Reck, S.J., Logan, G.M., Dintzis, F.R., Inglett, G.E.y Shvey, W.C. (1978). Influence of dietary fiber on trace element balance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 31: 5180-5184.
  56. Sen, A., D. Bergvinson, S. S. Miller, J. Atkinson, R. G. Fulcher, and J. T. Arnason. (1994). Distribution and microchemical detection of phenolic acids, flavonoids and phenolic acid amides in maize kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42: 1879- 1883.
  57. SICE, 2012. Sistema de información sobre comercio exterior, disponible en <http://www.sice.oas.org>, Consultada el 23 de Abril del 2012.
  58. Sosulski, F., K. Krygier, and L. Hogge. (1982). Free, sterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 30: 337-340.
  59. Stintzing FC, Stintzing AS, Carle R, Frei B, Wrolstad RE. (2002) Color and antioxidant prpiers of cianidin-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 6172-6180
  60. Tanaka, A. y Yamaguchi,.I. 1972. *Dry matter production, yield components and grain yield of the maize plant. .I. Fac. Agric. Hakkaido Univ.* 57: 71 - 132.
  61. Tecnologías limpias, (2004), disponible en: [http://www.tecnologiaslimpias.org/html/central/311602/311602\\_glob.htm](http://www.tecnologiaslimpias.org/html/central/311602/311602_glob.htm), consultada el 24 de octubre del 2012.
  62. Tecnologías limpias, (2004), disponible en: [http://www.tecnologiaslimpias.org/html/central/311602/311602\\_eca.htm#balance](http://www.tecnologiaslimpias.org/html/central/311602/311602_eca.htm#balance) de masa y energía. Consultada el 18 de Enero del 2013
  63. Timberlake C.F. (1980) Anthocyanins-Occurrence, Extraction and Chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 5(1)69-80.
  64. Tox Town, 2010. Enciclopedia de salud y seguridad del trabajo, disponible en <http://toxtown.nlm.nih.gov>, Consultada el 20 de abril del 2012.

65. Tünde Vatai, Mojca Skerget, Zeljko Knez, Sabine Kareth, Manuel Wehowski, Eckhard Weidner, Extraction and formulation of anthocyanin-concentrates from grapes residues, *Science Direct* 45( 2008) 32-36
66. Vela Enrique, Marzo 2011, *El maíz. Arqueología Mexicana*, 38: 7,17
67. Wallace T.C. and Giusti M.M. (2008). Determination of color, Pigment, and Phenolic Stability in yogurt systems Colored with Nonacylated Antocyanins from *Berberis boliviana* L. as compared to Other Natural/synthetic colorants. *Journal of Food Science*, 73(4)
68. Wrolstad R.E. (2000) Anthocyanins. In: Lauro GJ, Francis FJ, editors. *Natural Food Colorants*. New York, N.Y.: Marcel Dekker, Inc. p. 237-252.
69. Yang Z, Fan G, Gu Z, Han Y, Chen Z. (2007) Optimization ex16. Extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob using tristimulus colorimetry. *European Food Research and Technology*. DOI 10.1007/S 00217-007-0735-4: Springer-Verlag
70. Yañez, J., J. Salazar, L. Chaires, J. Jimenez, M. Marquez y E. Ramos. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Revista Avance y Perspectiva* 21: 313-319.
71. Yu, J., T. Vasanthan, and F. Temelli. (2001). Analysis of phenolic acids in barley by high-performance-liquid-chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 4352-4358.
72. Zhaohui, Z., and M. H. Moghadasian. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 109 (4): 691-702.
73. Zhendong Yang, Weiwei Zhai (2010). Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.) *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 11: 169–176