



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**OBTENCIÓN DE CIANIDINA 3-GLUCÓSIDO A PARTIR  
DE FUENTES VEGETALES Y MAÍZ CRIOLLO  
MORADO (Zea Mays)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A:**

**NATALIA JIMÉNEZ VILLARREAL**



MÉXICO, D.F.

2012.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

**Presidente:** Arturo Navarro Ocaña  
**Vocal:** José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio  
**Secretario:** Bertha Julieta Sandoval Guillén  
**1<sup>er</sup> Suplente:** Gloria Díaz Ruiz  
**2<sup>do</sup> Suplente:** Hilda Elizabeth Calderón Villagómez

### **SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

Laboratorio L-321  
Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto "E"  
Facultad de Química, Ciudad Universitaria

### **ASESOR**

---

Dr. Arturo Navarro Ocaña

### **ASESOR TÉCNICO**

---

Dra. Hilda Elizabeth Calderón Villagomez

### **SUSTENTANTE**

---

Natalia Jiménez Villarreal

## **AGRADECIMIENTOS**

*A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por haberme abierto las puertas de su institución durante mi formación académica desde mi ingreso a la Preparatoria N°5 hasta la culminación de mi licenciatura en la Facultad de Química, brindándome la oportunidad de ser parte de la máxima casa de estudios de la cual me siento muy orgullosa y a la que también le debo lo que hoy por hoy soy. Gracias....*

*A mi asesor, el **Dr. Arturo Navarro** por creer y confiar en mí para realizar el presente trabajo de investigación. Por todas y cada una de sus palabras, consejos y asesorías que me brindó durante el proyecto. Por compartirme sus conocimientos, la pasión, entrega y amor por la Química. Gracias....*

*A mi asesora técnica, la **Dra. Hilda Calderón** por sus sabios consejos y el apoyo durante toda mi estancia en el laboratorio.*

*A mis sinodales, la **Dra. Julieta Sandoval** y el **Dr. Guillermo de Jesús Aguilar** por su valioso tiempo empleado en la revisión de mi tesis y sus valiosos comentarios. Muchas Gracias....*

*Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo económico del proyecto:*

*PAPIIT-IN223611*

## DEDICATORIAS

Antes que nada quiero dedicarle mi Tesis al ser más sagrado que tengo en mi vida y a la cual le estoy infinitamente agradecida por todo lo que me ha dado desde siempre, a mi mamá: **Sonia Gabriela Villarreal Arredondo**. Gracias por no escatimar en tus esfuerzos y sacrificios, por hacer de mí una mujer de bien, por cuidarme, procurarme y ver por mí en las buenas y en las malas, por tu confianza y los ánimos. Gracias por tu inmenso amor, por ser mi amiga y confidente a la vez ¡eres grande!, sin duda mi mejor ejemplo a seguir, mi motor de vida simplemente mí todo.

A mi hermano, **Luis David** por ser un ejemplo de superación personal en mi vida mostrándome que las cosas se hacen con pasión y dedicación.

A mi Papá, **Francisco Sánchez** por todos los valores que me inculcaste, por tanto amor y cariño incondicional que me diste, por ser mi figura paterna, por todos tus sabios consejos y todos aquellos momentos inolvidables que vivimos juntos en familia. Siempre estás presente en mi mente y en mi corazón nunca te olvido y gran parte de este logro te lo debo a ti, Gracias....

Quiero dedicar mi trabajo de manera muy especial a:

A mis amigos y compañeros de la carrera, **Carolina, Adla, Luis, Andrea, Alicia, Selene, Karla, Martha, Eunice, Carlos, Luisa, Liz, Mónica, Violeta, Doris, Roció, Mariana y Fabiola** junto con mis compañeros colegas **Tania, Itzel, Leticia, Jazmín, Gabriela, Víctor y Ana** por haber compartido conmigo el gusto por la Química en uno o varios semestres durante la carrera, por todas las vivencias dentro y fuera de los salones de clase y laboratorios, fue un placer haber sido su compañera, que sea el principio de un futuro exitoso, "Carpe diem".

A todos mis compañeros del laboratorio 321, **Joanna, José, Gustavo, Guille, Narmi, Kipsain, Lula, Tania, Mariana, Brenda, Marky, Fernanda y Belén**, especialmente a **Jazmín** por su apoyo y complicidad durante todo el proyecto, a ti **Anabel** por tus consejos y tu calidez humana y finalmente a mi hermana y mi ángel **Ruthy**, por tu cariño, nobleza y por todo lo insuperable que hemos vivido juntas desde que nos conocimos. Gracias por los momentos vividos, por su apoyo, su alegría, las risas, tristezas, los regaños y preocupaciones, momentos también de dedicación, esfuerzo, pasión e ilusión. Fueron una grata compañía durante mi estancia en el laboratorio que sin duda fue y será la mejor etapa de mi vida.

A mis amigos, **Carolins, Emmita, Fernando, Edith, Roberto, Levi, Ernesto, Lino y Cristian**, ustedes forman parte de una etapa que nunca olvidare, estoy infinitamente agradecida con la vida por haberlos conocido y que me los hayan puesto en mi camino, este trabajo también se los dedico a ustedes. Porque nuestra amistad no muera y perdure por mucho tiempo más.

En general, **GRACIAS** a todos por ser parte de este gran sueño y gran paso en mi vida que hoy comienza con este manuscrito, gracias Dios por darme la oportunidad de vivir.....

*¡He aquí mi primer libro: mi "Tesis"... con cariño y admiración para todos ustedes!*

**Natys**

Mayo, 2012.

## CONTENIDO TEMÁTICO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS .....	4
ÍNDICE DE TABLAS .....	5
RESUMEN .....	6
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
1.1. Objetivo General .....	10
1.1.1. Objetivo Particular .....	10
<b>2. CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>11</b>
2.1. Colorantes .....	11
2.1.1. Pigmentos Naturales .....	12
2.2. Fenoles .....	13
2.3. Generalidades de las Antocianinas .....	17
2.3.1. Fuentes de Antocianinas .....	20
2.3.1.1. Frutas y Verduras .....	22
2.3.1.2. Cereal (Maíz morado) .....	24
2.4. Propiedades Biológicas de las Antocianinas .....	29
2.4.1. Actividad Antioxidante de las Antocianinas .....	30
2.5. Propiedades Químicas de las Antocianinas .....	32
2.5.1. Efecto del pH y la Temperatura en Antocianinas .....	33
2.5.2. Influencia del Oxígeno y la Luz sobre las Antocianinas .....	36
2.5.3. Copigmentación y Autocopigmentación de las Antocianinas .....	36
2.6. Extracción y Purificación de las Antocianinas .....	38
2.7. Métodos para la Cuantificación de Antocianinas .....	40
2.7.1. pH-Diferencial .....	40
2.7.2. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia .....	41
2.8. Aplicación de Antocianinas en Alimentos .....	44
<b>3. CAPÍTULO II: DESARROLLO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>46</b>
3.1. Diagrama de Flujo .....	46
3.2. Reactivos .....	47
3.3. Equipos .....	47
<i>PARTE I: Búsqueda de Materiales como Fuentes Potenciales de Antocianinas</i>	
3.4. Muestreo .....	48
3.5. Selección .....	48
3.5.1. Preparación de las muestras .....	49
3.5.2. Determinación del contenido de Humedad .....	49
3.5.3. Preparación de las muestras para el Screening .....	49
3.6. Implementación del Método .....	50
3.6.1. Cromatografía en Capa Fina (CCF) .....	50
3.7. Determinación Cualitativa .....	51

*PARTE II: Procesos de Extracción*

3.8. Extracción de Antocianinas mediante Métodos Químicos .....	51
3.8.1. Implementación del Método .....	51
3.8.2. Extracción con Disolventes Orgánicos.....	52
3.8.3. Extracción con Resinas Hidrofóbicas.....	52
3.8.4. Extracción con Ácidos Orgánicos .....	53
3.9. Extracción asistida mediante una Fermentación Láctica .....	53
3.9.1. Microorganismos y su Conservación .....	53
3.9.2. Activación de las Cepas.....	54
3.9.3. Verificación Morfológica de los Microorganismos.....	54
3.9.4. Fermentación Láctica.....	54

*PARTE III: Determinación Cuantitativa*

3.10. Cuantificación de Antocianinas Totales Monoméricas por pH-Diferencial.....	56
3.10.1. Métodos Químicos .....	56
3.10.2. Extracción asistida por Fermentación Láctica.....	56
3.11. Cuantificación de Antocianinas por HPLC .....	57
3.11.1. Implementación del método .....	57
3.11.2. Preparación de muestras.....	57
3.11.3. Elaboración de Curva Patrón y Cuantificación por HPLC.....	58

*PARTE IV: Cianidina-3-glucósido*

3.12. Optimización de Extracción a Escala Preparativa .....	58
---	----

**4. CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....**61

*PARTE I: Búsqueda de Materiales como Fuentes Potenciales de Antocianinas*

4.1. Muestreo y Selección.....	61
4.2. Determinación del contenido de Humedad .....	61
4.3. Identificación Cualitativa .....	63

*PARTE II: Procesos de Extracción*

4.4. Extracción Disolventes Orgánicos, Resinas Hidrofóbicas y Ácidos Orgánicos .....	68
4.5. Extracción asistida por una Fermentación Láctica.....	69
4.5.1. Fermentación Láctica.....	70

*PARTE III: Determinación Cuantitativa*

4.6. Cuantificación de Antocianinas Totales Monoméricas por pH-Diferencial.....	73
4.6.1. Métodos Químicos .....	73
4.6.1.1. Extracción con Disolventes Orgánicos .....	73
4.6.1.2. Extracción con Resinas Hidrofóbicas .....	74
4.6.1.3. Extracción con Ácidos Orgánicos.....	75

4.6.2. Extracción asistida por una Fermentación Láctica.....	78
4.7. Cuantificación de Antocianinas por HPLC .....	79
4.7.1. Métodos Químicos .....	79
4.7.1.1. Resinas Hidrofóbicas.....	79

*PARTE IV: Cianidina-3-glucósido*

4.8. Optimización de Extracción a Escala Preparativa .....	81
4.8.1. Identificación de Cianidina-3-glucósido.....	88

<b>CONCLUSIONES</b> .....	95
---------------------------	----

<b>ANEXOS</b> .....	97
---------------------	----

ANEXO I [Curva Patrón] .....	97
------------------------------	----

**REFERENCIAS**

- Bibliográficas .....	99
- Electrónicas .....	107



ÍNDICE DE FIGURAS

■ Marco Teórico:

Figura 2.1. Esquema de la biosíntesis de polifenoles a partir de Fenilalanina .....	14
Figura 2.2. Ruta del Ácido shiquímico .....	15
Figura 2.3. Estructura química del esqueleto básico de los flavonoides.....	16
Figura 2.4. Estructuras básicas de varias clases de flavonoides.....	17
Figura 2.5. Estructura química de una antocianina y antocianidina.....	18
Figura 2.6. Estructura de los monosacáridos en estructuras de antocianinas.....	19
Figura 2.7. Estructura química general de una antocianina.....	19
Figura 2.8. Imágenes físicas de las fuentes de antocianina .....	21
Figura 2.9. Variedad de coloración en el maíz (Zea mays L.) .....	26
Figura 2.10. Tipos de antocianinas presentes en diferentes fuentes vegetales .....	28
Figura 2.11. Estructura química de los antocianos .....	29
Figura 2.12. Cambios en la estructura de las antocianinas a valores de pH .....	34
Figura 2.13. Distribución de las estructuras de antocianinas en función del pH.....	34
Figura 2.14. Formación de un complejo de copigmentación.....	38
Figura 2.15. Espectro de absorción de las antocianinas.....	40
Figura 2.16. Cromatograma de Grosella negra a partir de RP-HPLC.....	43

■ Desarrollo Experimental:

Figura 3.1. Diagrama de flujo .....	46
Figura 3.2. Maíz morado desgranado, su olote y su siembra por temporal .....	48
Figura 3.3. Pozol.....	53
Figura 3.4. Registro de la Fermentación Láctica.....	55
Figura 3.5. Optimización de la Extracción a Escala Preparativa.....	60

■ Resultados y Discusión:

Figura 4.1. Cromatoplaça 1 .....	64
Figura 4.2. Cromatoplaça 2 .....	65
Figura 4.3. Cromatoplaça 3 .....	65
Figura 4.4. Cromatoplaça 4 .....	65
Figura 4.5. Cromatoplaça 5 .....	66
Figura 4.6. Tinción diferencial de Gram 1 .....	70
Figura 4.7. Gráficos N°1. ....	71
Figura 4.8. Gráfico N°2.....	77
Figura 4.9. Cromatograma 1.....	79
Figura 4.10. Cromatograma 2.....	80
Figura 4.11. Gráfico N°3.....	86
Figura 4.12. Gráfico N°4.....	87
Figura 4.13. Cromatograma 3.....	88
Figura 4.14. Cromatograma 4.....	89
Figura 4.15. Cromatograma 5.....	90
Figura 4.16. Cromatograma 6.....	92
Figura 4.17. Cromatograma 7.....	94

INDICE DE TABLAS

■ **Marco Teórico:**

Tabla 2.1.- Clasificación de los colorantes .....	12
Tabla 2.2.- Clasificación de polifenoles según su ruta biosintética .....	15
Tabla 2.3.- Contenido de antocianos en alimentos.....	23
Tabla 2.4.- Ficha técnica del Maíz (Zea mays) .....	25
Tabla 2.5.- Contenido total de antocianinas en maíces de grano pigmentado.....	25
Tabla 2.6.- Componentes en extracto de antocianinas de corontas de maíz.....	26
Tabla 2.7.- Clasificación estructural de antocianinas y el color que proporcionan.....	27
Tabla 2.8.- Contenido de antocianinas en diferentes especies de bayas .....	28
Tabla 2.9.- Métodos de extracción de antocianinas .....	39

■ **Desarrollo Experimental:**

Tabla 3.1.- Selección de muestras vegetales .....	48
Tabla 3.2.- Sistemas de elución para extractos de la búsqueda de antocianinas.....	50
Tabla 3.3.- Preparación de la muestra.....	58

■ **Resultados y Discusión:**

Tabla 4.1.- Contenido de Humedad .....	62
Tabla 4.2.- Monitoreo de la Fermentación Láctica.....	71
Tabla 4.3.- Antocianinas totales del Maíz morado (Disolventes Orgánicos) .....	73
Tabla 4.4.- Antocianinas totales del Maíz morado (Resinas Hidrofóbicas) .....	74
Tabla 4.5.- Antocianinas totales del Maíz morado (Ácidos Orgánicos) .....	75
Tabla 4.6.- Antocianinas totales de la Fermentación Láctica .....	78
Tabla 4.7.- Antocianinas totales en Frutos (Disolventes Orgánicos) .....	83
Tabla 4.8.- Antocianinas totales en Hojas de Ciruelo (Disolventes Orgánicos) .....	84
Tabla 4.9.- Antocianinas totales en Frutos (Resinas Hidrofóbicas) .....	85
Tabla 4.10.- Antocianinas totales en Hojas de Ciruelo (Resinas Hidrofóbicas) .....	86

## RESUMEN:

El color en los alimentos es debido principalmente al tipo de pigmentos naturales presentes, pero los colorantes sintéticos o artificiales son añadidos al producto final para conferirle un color determinado. Debido al incremento en la demanda de alimentos naturales, la producción de colorantes naturales alimenticios a nivel industrial de manera práctica y económica es hoy en día una meta para aquellas industrias que se dedican a distribuir ingredientes alimenticios. Sin embargo, la disponibilidad de fuentes de pigmentos naturales, requerimientos de procesos de extracción y estabilidad de colorantes e idoneidad de su uso debe ser tomado en cuenta para la producción de dichos ingredientes. Han reportado en la literatura que las antocianinas, una clase de flavonoides, poseen una serie de actividades biológicas de gran importancia principalmente a su actividad antioxidante y a sus beneficios a la salud humana ya que se ha relacionado su consumo con la reducción de la incidencia en enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías.

Hay una fuente importante de colorantes naturales presentes en frutas rojas tales como cerezas, ciruelas, fresas, frambuesas, zarzamoras, uvas, pasas rojas y negras (Jackson y otros, 1978; Frankel y otros, 1995; Lepidot y otros, 1999). Las restricciones en el uso de colorantes sintéticos en los alimentos han conducido al interés en el uso potencial de las antocianinas como colorante alimenticio en bebidas, jarabes, jugos de frutas, gelatinas, mermeladas, helados, dulces de pasta y bebidas fermentadas, así como en pasta dental, productos farmacéuticos, cosméticos y otros similares (Clydesdale y Francis, 1976).

Debido a la importancia biológica que posee la cianidina-3-glucósido es necesario hallar una fuente rica en este compuesto y desarrollar un procedimiento de extracción más eficiente, de menor costo, compatible con su estabilidad y que sea amigable al ambiente. El presente trabajo se enfocó en la búsqueda de las principales fuentes de cianidina-3-glucósido, un tipo de antocianina que se encuentra en la naturaleza distribuida principalmente en frutos, hortalizas y cereales.

Para desarrollar el trabajo, se realizó un rastreo de las principales fuentes de antocianinas seleccionando así seis frutos, una hortaliza y un cereal, las cuales mostraron tener una mayor concentración de dicho compuesto. De estas muestras se seleccionó al maíz criollo morado (*Zea mays*) para trabajar experimentalmente con cuatro métodos de extracción: tres de ellos químicos; con disolventes orgánicos en solución acida, resinas hidrofobicas y soluciones de ácidos orgánicos, y el cuarto de manera microbiológica; asistiendo la extracción mediante una fermentación láctica.

La implementación del método en el maíz morado consistió en el análisis cualitativo de antocianinas por cromatografía en capa fina (CCF), la cuantificación total de antocianinas monoméricas por pH-diferencial y finalmente la cuantificación de cianidina-3-glucósido en HPLC con el objeto de obtener extractos enriquecidos en este compuesto. Una vez implementado el método se trabajó con las siguientes muestras optimizando el método a escala preparativa: (*Prunus domestica L.* ó ciruela, *Rubus idaeus* ó frambuesa, *Vaccinium corymbosum* ó mora azul y *Rubus ulmifolius* ó zarzamora).

La concentración de cianidina-3-glucósido se cuantificó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y se observó que las hojas de ciruelo (*Prunus cerasifera*) contenían la mayor cantidad de cianidina-3-glucósido con 395.48 mg/g de hoja seca, utilizando una extracción con metanol ácido tras un proceso de purificación con resina.

Se puede concluir que la cianidina-3-glucósido se encuentra en las diferentes fuentes vegetales y maíz criollo morado que se estudiaron en donde la concentración puede variar dependiendo del tratamiento de extracción que se utilice.

## 1. INTRODUCCIÓN:

La calidad de un alimento depende, en primer lugar, de su valor nutritivo, pero es evidente que los caracteres organolépticos también desempeñan un papel importante, cuando no primordial. Es lógico, ya que el consumidor establece un primer contacto con los alimentos a través de su aspecto, forma y color, y posteriormente con su textura y sabor. El color proporciona información sensorial, que puede interactuar con las propiedades gustativas, olfatorias y de textura, que determinan la aceptabilidad del producto. Por tanto, el color en la mayoría de los alimentos es un factor a tener en cuenta tanto en su forma natural como elaborada y le corresponde un tono mediante el cual el consumidor los identifica.

En consecuencia, aunque el alimento sea de elevado valor nutritivo, aromático y este bien texturizado, este será ingerido a menos que presente un color correcto. En principio, puede pensarse que el color es algo trivial, fruto del capricho del consumidor. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto, mediante numerosos estudios, que muchos individuos tienen dificultad en apreciar el sabor de los alimentos cuando no están coloreados en forma adecuada. Así por ejemplo, las bebidas refrescantes a base de zumo de naranja en las que preferentemente se requieren lo más natural posible, tras su procesado para asegurar la inocuidad del producto, se obtienen jugos con poco olor, color y mala aceptación. Es por eso que aunque se restringe la cantidad de aditivos alimentarios en estos últimos, el uso de colorantes o algún otro tipo de aditivo para mejorar la calidad sensorial es factible y aplicable.

Los colorantes son, entre los aditivos alimentarios, los que desde los años setenta han suscitado por parte de los consumidores una mayor oposición. Sin duda, esto es debido a que muchos de ellos son productos de síntesis química, la imagen misma de los aditivos “artificiales”. De hecho, se han prohibido varios colorantes sintéticos derivados del carbón debido a su toxicidad. La lista autorizada en los países miembros de la UE comprende 24 colorantes, de los cuales 12 son de origen natural.

Al ser el color “adecuado” del alimento uno de los elementos no está cerrado pero, para reemplazar los colorantes artificiales las investigaciones se orientan hacia los productos naturales, a condición de que sus costos de producción sean competitivos con los colorantes sintéticos que, además, tienen la ventaja de proporcionar coloraciones intensas y regulares.

Por su naturaleza, ciertos pigmentos naturales, además de sus características cromáticas, poseen propiedades vitamínicas y antioxidantes, siendo esto último una razón poderosa que justifica plenamente el interés de los científicos por la investigación de todos los aspectos relacionados con la extracción, purificación y estabilización de los pigmentos naturales para su empleo en alimentos. En otro aspecto, los pigmentos naturales que ofrecen mayores perspectivas son carotenos, flavonoides y antocianos.

Se estima que las antocianinas son los colorantes rojos de origen vegetal con mayor porvenir para ser utilizados como colorantes naturales en alimentos. Las antocianinas son pigmentos naturales de las plantas; se encuentran en la naturaleza en forma de heterósidos y son responsables de los colores rojo violeta y azul existentes en flores y frutos. La utilización de los pigmentos antociánicos en la industria alimentaria está supeditada a la estabilidad que puedan tener frente a los tratamientos fisicoquímicos de preparación del producto, como durante el almacenamiento de los mismos.

## OBJETIVOS:

### 1.1. Objetivo General:

Desarrollar un método para la detección, cuantificación y obtención de cianidina 3-glucósido a partir de diferentes fuentes vegetales y de maíz criollo morado (Zea Mays), que sirvan como propuesta para un modelo de obtención de un estándar comercial.

#### 1.1.1. Objetivos particulares:

- ❖ Realizar un muestreo y selección de las fuentes vegetales potenciales en su contenido antociánico.
- ❖ Desarrollar un sistema de detección por Cromatografía en Capa Fina (CCF) que permita la identificación cualitativa del perfil de antocianinas presentes en las fuentes vegetales.
- ❖ Establecer las condiciones adecuadas para la extracción de antocianinas mediante métodos químicos y microbiológicos.
- ❖ Obtener extractos enriquecidos en antocianinas.
- ❖ Determinar la cantidad total de antocianinas monoméricas para cada uno de los extractos obtenidos.
- ❖ Cuantificar la concentración de cianidina 3-glucósido mediante Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC) para cada uno de los extractos obtenidos.
- ❖ Determinar las condiciones óptimas de extracción por tecnologías limpias a escala preparativa, obtención de antocianinas (cianidina-3-glucósido).

## 2. CAPITULO I:

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Colorantes:

El color se refiere a la percepción humana de los materiales coloreados: rojo, verde, azul, etc. Los alimentos tienen uno debido a su capacidad para reflejar o emitir diferentes cantidades de energía a longitudes de onda que estimulen la retina del ojo. Los pigmentos son sustancias naturales de las células y tejidos vegetales y animales que confieren color (Elbe y Schwartz, 2000). Su uso tiene una larga historia en la civilización humana. Además de la atracción que ejercen, los compuestos que imparten color a los alimentos influyen en la fisiología de los consumidores por lo que existe un vínculo muy estrecho entre el consumo y la salud (Delgado, 2003). La preocupación por la seguridad en los alimentos, ha llevado a muchas empresas a revisar la formulación de sus productos y a sustituir, cuando es tecnológicamente factible, los colorantes sintéticos por los naturales. Por tanto, la industria alimenticia es cada vez más exigente con respecto al uso de colorantes sintéticos, lo que ha impulsado a reevaluar el uso de colorantes naturales.

Los colorantes son sustancias que presentan color a los materiales. El término colorante se utiliza comúnmente en la industria textil. En la industria alimentaria de los EE UU, se entiende por colorante aquel que posee una pureza de grado alimentario, es soluble en agua y está certificado por la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA). Estos colorantes específicos se conocen como << colores certificados >>, asignándose a cada uno un número FD&C<sup>1</sup>. Además de la lista aprobada de colorantes certificados, existe también la FD&C para lacas. Las lacas son colorantes que se extienden sobre un sustrato y son dispersables en aceite. Hay otros colorantes y lacas aprobados para su uso en otros países, en los que las especificaciones son establecidas por la Comunidad Económica Europea (CEE) ó LA Organización Mundial de la Salud (OMS).

También se pueden utilizar pigmentos naturales o sustancias sintéticas idénticas al pigmento natural. En la Tabla 2.1.- se muestra una clasificación de los colorantes y un ejemplo de cada clase de los mismos (Elbe y Schwartz, 2000).

---

<sup>1</sup> La designación FD&C significa que el colorante se puede utilizar en los alimentos, los medicamentos y los cosméticos.



**Tabla 2.1.- Clasificación de los colorantes.**

	Colorante	Ejemplo
<b>A</b>	<b>Certificado</b>	
1	Colorante	FD&C Rojo N°40
2	Laca	Laca de FD&C Rojo N°40
<b>B</b>	<b>Exento de certificación</b>	
1	Pigmentos naturales	Antocianina, jugo concentrado, extracto de bija
2	Sintéticos (idénticos a los naturales)	β-Caroteno

(Elbe y Schwartz, 2000).

### 2.1.1. Pigmentos Naturales:

Los pigmentos naturales son generados por microorganismos, vegetales, animales o minerales. El mercado mundial de pigmentos naturales representa 940 millones de dólares al año en ventas y, debido a la preocupación del consumidor por la ingesta de productos que no alteren o ayuden a su salud, crece alrededor de 4% al año (Britton, 1999). Los pigmentos naturales difieren ampliamente en su estructura química y en su origen con los sintéticos. Aunque hay colorantes poco comunes, como el ácido carmínico, los más distribuidos en los alimentos pueden agruparse en seis categorías:

- 1) Carotenoides
- 2) Clorofilas
- 3) Pigmentos fenólicos:
  - Flavonoides
  - Antocianinas
  - Taninos
- 4) Betalaínas
- 5) Hemopigmentos
- 6) Otros pigmentos naturales

Los cuatro primeros son de fuentes vegetales, aun cuando llegan a estar presentes en alimentos de origen animal, a los que ingresan a través de la dieta. La mayoría de los pigmentos vegetales se localizan en el protoplasma de las células, dentro de los organelos especializados llamados plástidos, en algunos casos, cuando son solubles en agua, se encuentran disueltos en las vacuolas de las células. El quinto grupo solo se encuentra en productos de origen animal. En el sexto grupo se incluyen pigmentos que imparten color tanto a los tejidos vegetales como animales.

Son poco abundantes en la naturaleza, pero no por eso menos importante, debido a las características específicas de cada uno. La estructura química determina propiedades de los pigmentos que van más allá del color, aunque sea esta su característica evidente. La estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento; su reactividad con otros compuestos químicos para determinar tanto el color como la durabilidad o cambio de este; su posible toxicidad, por lo que es necesario en algunos casos certificarlos para que cumplan con las normas oficiales; y su posible capacidad como micronutrientes, son algunas de las características de los pigmentos (Guerrero, 2006).

## **2.2. Fenoles:**

Químicamente, los fenoles pueden ser definidos como sustancias que poseen un anillo aromático teniendo uno o más sustituyentes hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales (Shahidi y otros, 1995). Los compuestos fenólicos están presentes en muchas plantas. Ellos están directamente relacionados con las características de los alimentos tales como sabor, palatabilidad, valor nutricional, efectos farmacológicos y toxicológicos, y descomposición microbiana. Entre los compuestos fenólicos naturales, de los cuales aproximadamente 8000 son conocidos por estar presentes en plantas, los flavonoides y sus parientes forman el grupo más grande con más de 5000 estructuras conocidas (Harborne, 1986). Los polifenoles de las plantas son biosintetizados por dos rutas metabólicas: la del ácido shiquímico y la ruta del ácido malónico. La vía del ácido shiquímico es la ruta por la que se producen la mayoría de los polifenoles de las plantas superiores, utilizando como sustrato la eritrosa-4-fosfato, de la vía de las pentosas fosfato, y el ácido fosfoenolpirúvico proveniente de la glucólisis (Figura 2.2.).

Uno de los productos de esta vía es la fenilalanina, aminoácido esencial sintetizado en el metabolismo primario de las plantas, entra al metabolismo cuando la enzima amonio liasa (PAL) cataliza la eliminación de un amonio, convirtiendo a la fenilalanina en ácido cinámico (Figura 2.1.). Debido a los fenoles que existen de los polifenoles, se hará referencia solo a la clasificación según la ruta biosintética. Ver Tabla 2.2.-. Solamente una pequeña familia de polifenoles son considerados a ser importantes en los alimentos. Ellos son los ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico y sus derivados, y los flavonoides comunes y sus glucósidos.

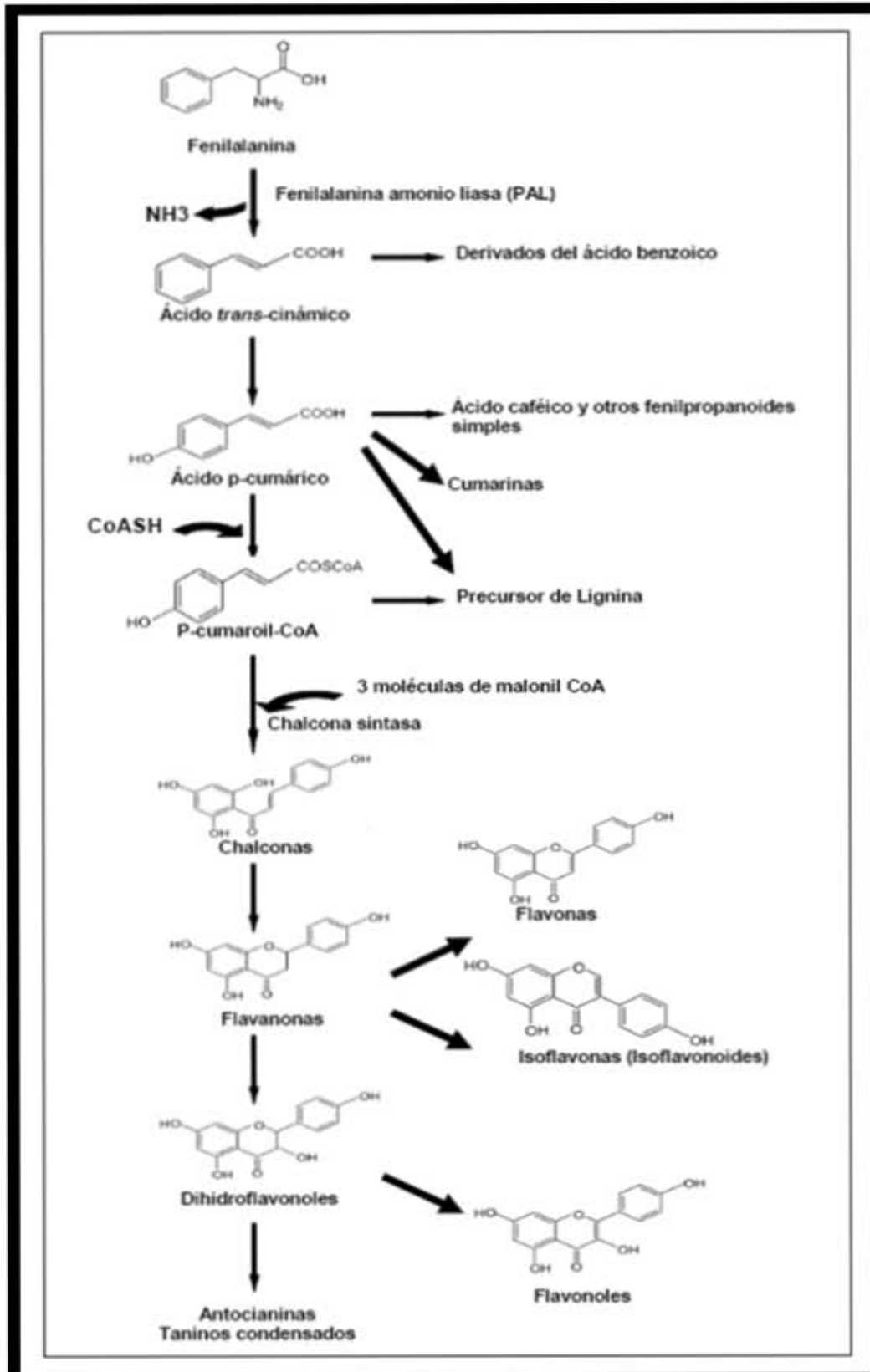


Figura 2.1. Esquema de la biosíntesis de polifenoles a partir de la Fenilalanina (Murcia, 2003).

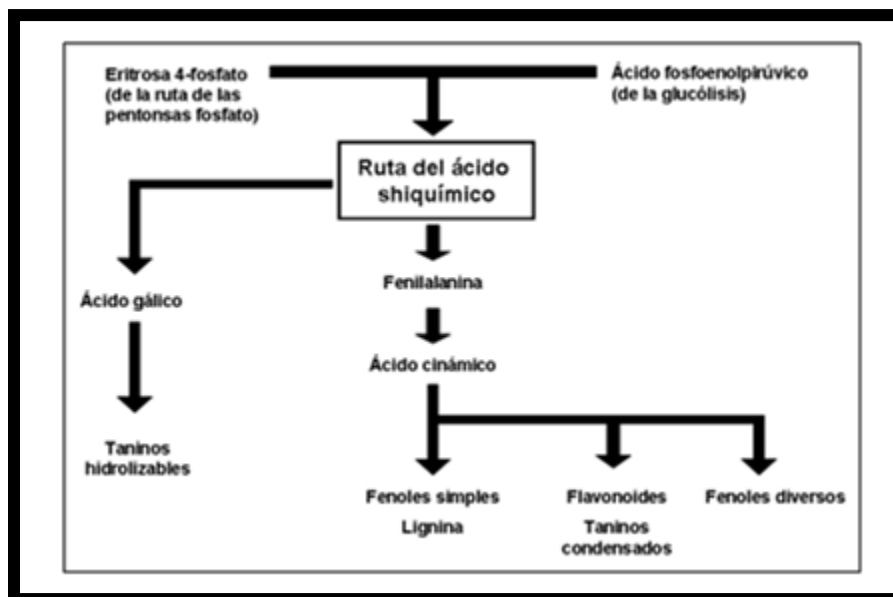


Figura 2.2. La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la Fenilalanina, un producto de la ruta del ácido shiquímico (Murcia, 2003).

Tabla 2.2.- Clasificación de polifenoles según su ruta biosintética.

Ruta Biosintética	Compuestos fenólicos Derivados	Ejemplos
<b>Ruta del ácido shiquímico</b>	Fenoles sencillos	Presente en plantas de las familias Ericaceae y Rosaceae (Hidroquinonana)
	Ácidos fenólicos	- Ácido benzoico (ácido caféico, ferúlico, p-cumárico, clorogénico)
	Cumarinas	- Sencillas (esculetol, escopoletol) - Complejas (visnadina, prinocumarina)
	Lignanós	Presentes en briofitas, helechos y semillas de plantas superiores (enterolactona, enterodiol)
<b>Ruta de los poliacetatos</b>	Quinonas	Distribuidas en microorganismos, insectos y plantas, principalmente en las familias Rubiaceae, Rhamnaceae y Polygonaceae. - Benzoquinonas - Naftoquinonas - Antraquinonas
<b>Rutas del ácido shiquímico y del ácido malónico</b>	Flavonoides	- antocianinas - flavanoles - flavanonas - flavonoles - flavonas - isoflavonas

(Taiz y Zeiger, 2006), (Murcia, 2003), (Carretero, 2000), (Boluda, 2005), (Isaza, 2007), (Martinez, 2005) y (Portalfama.com).

Las antocianinas y los flavonoides son pigmentos en una variedad de frutas y vegetales. Muchos compuestos fenólicos participan en reacciones de oscurecimiento enzimático y no enzimático. En adición al color, los polifenoles también contribuyen al sabor de los alimentos y otras cualidades (Pierpoint, 1983). Otra importante función de los compuestos polifenólicos en términos de los beneficios a la salud humana es el aumento de evidencia que sugiere que los compuestos polifenólicos en la dieta tienen a largo plazo beneficios en la salud y pueden prevenir o reducir el riesgo de algunas enfermedades crónicas (Francis, 2000).

Los compuestos fenólicos son considerados como un grupo de compuestos que contribuyen a la actividad antioxidante de las frutas y vegetales. Los compuestos polifenólicos típicos que poseen actividad antioxidante incluyen a los tocoferoles, a los flavonoides, a los derivados del ácido cinámico y otros compuestos. Los flavonoides constituyen uno de los grupos más distintivos de metabolitos secundarios en plantas superiores. El término flavonoide comprende todos aquellos compuestos cuya estructura está basada en aquella de la flavona (2-fenilcromona).

Flavonoide (del latín flavus, “amarillo”) es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Son sintetizados a partir de una molécula de Fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como “vía biosintética de los flavonoides”, cuyo producto, la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa. Su esqueleto básico de difenilpropano ( $C_6-C_3-C_6$ ) consta de dos grupos fenilo (A y B) unidos por un puente de tres carbonos que forma un anillo heterocíclico oxigenado (anillo C). (Ver Figura 2.3.).

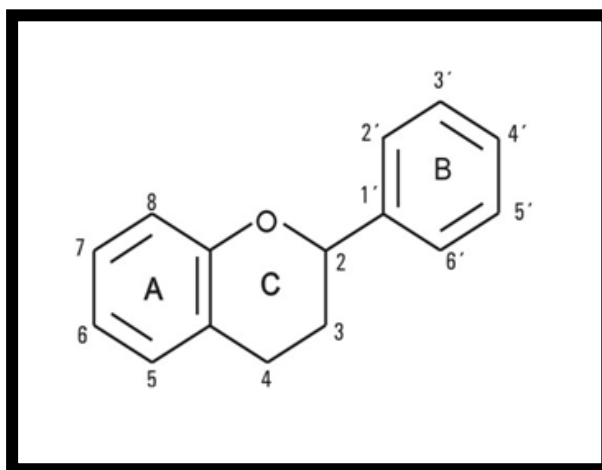


Figura 2.3. Estructura química del esqueleto básico de los flavonoides (Shahidi, y otros, 1995).

En la Figura 2.4., se muestran los principales flavonoides presentes en los alimentos vegetales siendo estos últimos una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua (Winkel-Shirley, 2001). La presencia o ausencia de un grupo hidroxilo unido a la posición 3 determina la subdivisión en las dos clases principales de flavonoides.

- a) Los 3-hidroxi flavonoides (flavanoles, flavonoles, flavanoles, flavan-3,4-dioles o leucoantocianinas, antocianidinas, proantocianidinas o taninos condensados) y
- b) Los flavonoides no hidroxilados en la posición 3 (flavonas, isoflavonas, flavanonas) (García, 2005.).

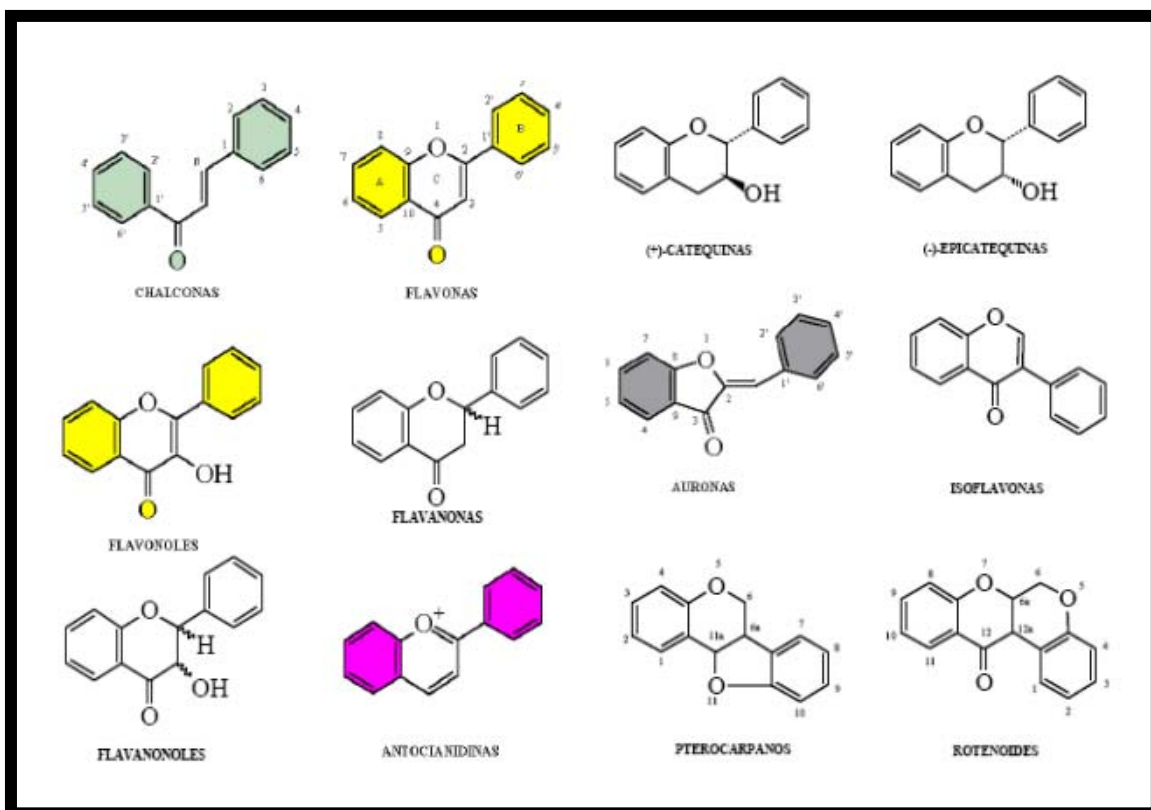


Figura 2.4. Estructuras básicas de varias clases de flavonoides.

### 2.3. Generalidades de las Antocianinas:

La palabra antocianina deriva de los vocablos griegos 'άνθος (anthos) que significa "flor", y 'κυανός (kyanos) que significa "azul" (Nollet, 2000). Las antocianinas son el grupo más importante de pigmentos flavonoides de plantas solubles en agua para el ojo humano (Harborne y Williams, 1988) y (Strack, 1994), y son responsables de los colores

rojos, amarillo, purpuras y azul en frutas y vegetales al igual que en flores (Rivas-Gonzalo, 2003) y (Strack, 1993). Las antocianidinas (o agliconas) son la estructura básica de las antocianinas y están formadas por un anillo aromático A, unido a un anillo heterocíclico C que contiene oxígeno, que también está unido a un tercer anillo aromático B por un enlace carbono-carbono (Ver Figura 2.5.).

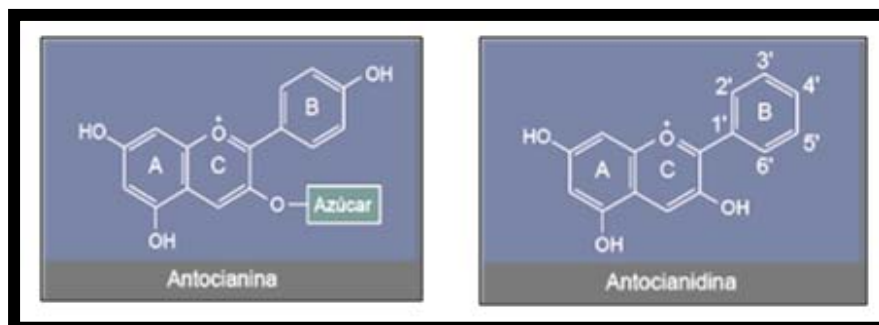


Figura 2.5. Estructura química de una antocianina y antocianidina.

Cuando las antocianidinas se encuentran en su forma glicosilada (unidas a una molécula de azúcar) se les conoce como antocianinas, los monosacáridos que comúnmente se encuentran asociados a las antocianidinas son D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-arabinosa y D-xilosa (Ver Figura 2.6.). Normalmente los monosacáridos se unen con los grupos hidroxilo de la posición 3 de la antocianidina, mientras que los disacáridos lo hacen con los hidroxilos 3 y 5 o bien en las posiciones 3 y 7. El azúcar le proporciona mayor estabilidad y solubilidad al pigmento. Algunas veces las antocianinas se encuentran aciladas por ácidos orgánicos como el caféico, p-cumárico, acético, ferúlico, sinápico, p-hidroxibenzoico, malónico, oxálico y málico (Delgado-Vargas, y otros, 2000). Las antocianinas, entre todos los flavonoides, son las únicas que sufren una transformación reversible dependiente del pH en soluciones acuosas, por tanto son sustitutos potenciales para los colorantes sintéticos debido a sus colores atractivos brillantes y su solubilidad en el agua permiten su incorporación a sistemas alimenticios acuosos también como posibles beneficios a la salud (Mazza y Miniati, 1993), (Ver Figura 2.6.). Recientemente, los investigadores se han enfocado sobre los beneficios en la salud de estos pigmentos, especialmente en su actividad antioxidante (Camire, 2002), actividad antimutagénica (Gasiorowski, 1997) y (Peterson y Dwyer, 1998) y actividad quimiopreventiva (Koide, 1997) y (Zhao, 2004), contribuyendo a reducir la incidencia de enfermedades crónicas.

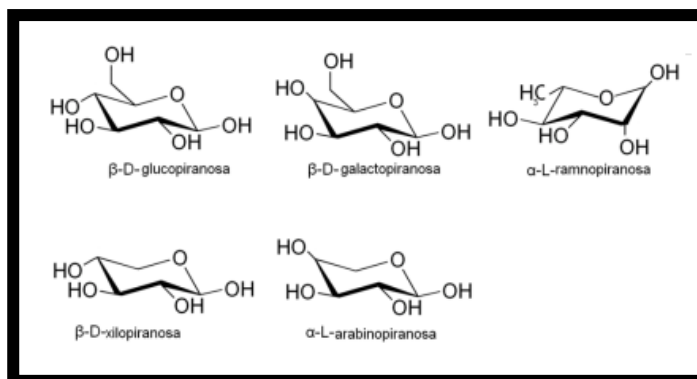


Figura 2.6. Estructura de los monosacáridos más comunes encontrados en las estructuras de las antocianinas (Boulton, 2001).

En forma natural, la estructura de los flavonoides (antocianidina) se encuentra unida mediante un enlace o-glicosídico a uno o a varios azúcares y a este compuesto se le denomina antocianidina simple (Ver Figura 2.7.). Se conocen más de 22 moléculas diferentes, las más comunes son la pelargonidina, delphinidina y cianidina (Salisbury, 1994).

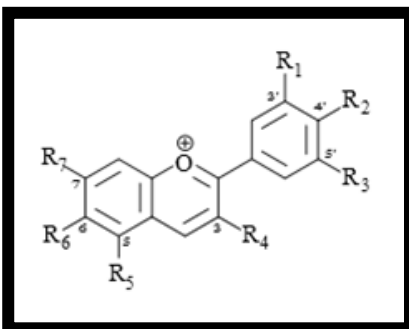


Figura 2.7. Estructura química general de una antocianidina (Nollet, 2000). Ver en la tabla 2.3 los modelos de sustitución de los radicales (Castañeda-Ovando, 2009).

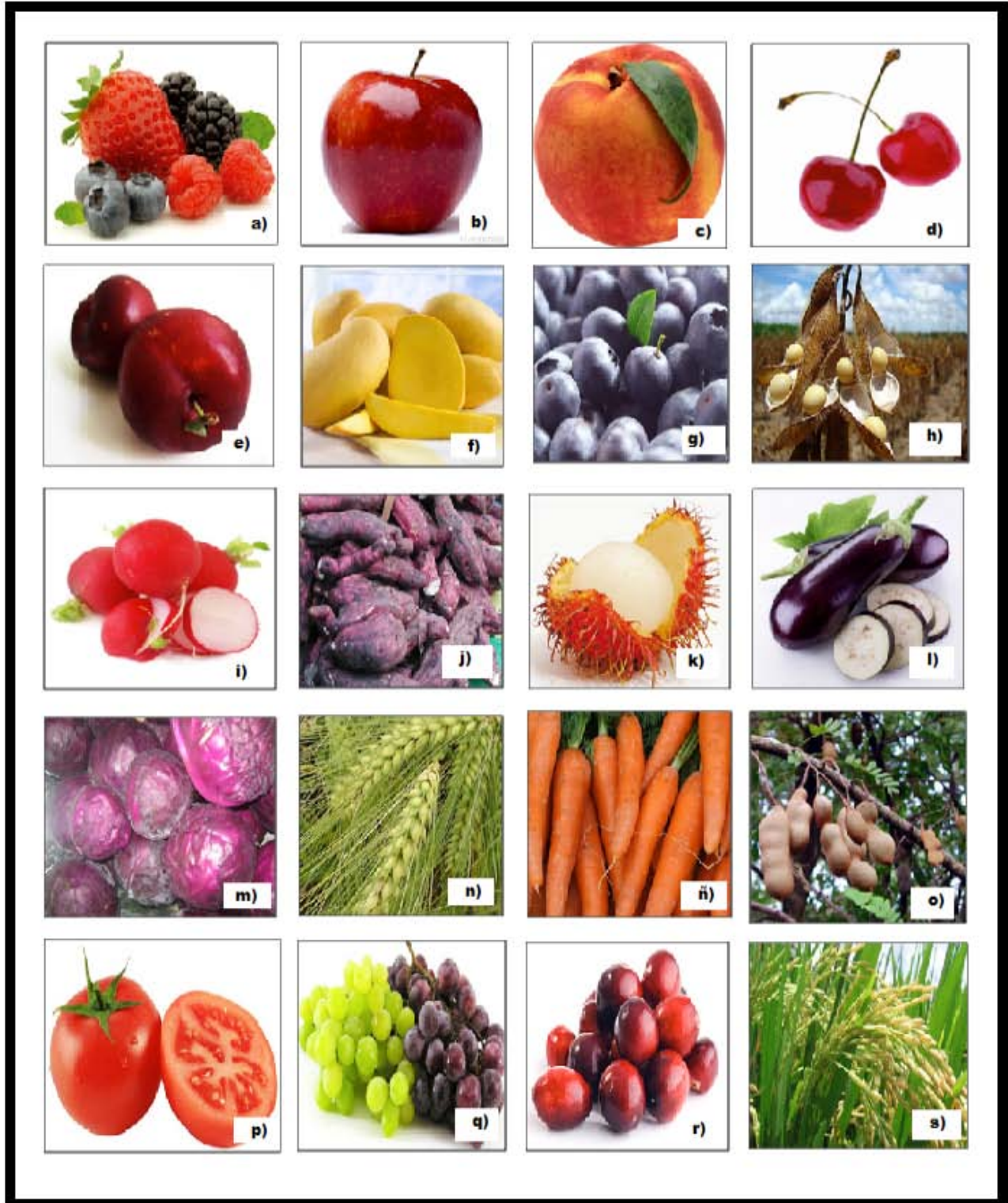
Por otro lado, existen cuatro formas principales estables de antocianinas: el catión flavilio de color rojo, la base quinoidal azul, la pseudobase chalcona incolora y la chalcona, también incolora. En un pH menor de 2.0 las antocianinas se encuentran predominantemente en la forma de catión flavilio exhibiendo coloración roja. La hidratación rápida del catión flavilio ocurre en la posición C-2 para generar la pseudobase de carbinol incolora a intervalos de pH de 3.0 a 6.0 (He, 2009) y (Castañeda-Ovando, 2009). El color de las antocianinas depende en primer lugar de los grupos sustituyentes que se presentan en el anillo B. Cuando se encuentran grupos metilo, como sucede en la Peonidina, provocan un efecto de enrojecimiento, mientras que la presencia de grupos hidroxilo genera colores azulados como en la delphinidina.



Por otro lado, se asocian con frecuencia a flavonas o flavonoles, que hacen que se vuelvan más azules, también se asocian entre sí, especialmente a concentraciones elevadas, lo que produce un efecto de enrojecimiento o de azulado, dependiendo de la antocianina y del pH de las vacuolas donde se acumulan. La mayoría de las antocianinas son rojizas en soluciones ácidas, pero se tornan de color púrpura y azul cuando aumenta el pH (Azcón-Bieto, 2000).

### 2.3.1. Fuentes de Antocianinas:

Muchas frutas y vegetales deben sus colores atractivos azul, violeta o rojo a la presencia de antocianinas. En 70 especies de 33 familias de angiospermas las antocianinas son encontradas en la membrana enlazadas a los antocianoplastos localizados dentro de la principal célula vacuola. Especialmente las frutas de las *Vitaceas* (uvas) y la *Rocaceae* (manzana, cereza, ciruela, durazno, fresa, zarzamora, frambuesa) son caracterizadas por su contenido en antocianinas. Otras familias con contenido de pigmento antociánico incluyen a la *Ericácea* (arándano), *Saxifragácea* (pasa roja y negra), *Caprifoliácea* (baya del sauco), *Solanácea* (tamarindo, arándano, tomate y berenjena), *Graminea* (maíz, cebada y arroz), *Anacardiácea* (mango), *Sapindácea* (lichi), *Rutácea* (sanguínea), *Mavácea* (rosellón), *Fabácea* (soya), *Apicéae* (zanahoria); *Brasicáceae* (col morada, rábano), *Convolvulácea* (camote), *Berberidácea* y otras (Ver figura 2.8). Un gran número de más de 200 diferentes antocianinas pueden ser encontradas en estas plantas pero debido a que solamente seis antocianidinas son comunes, esta variación es principalmente debido al tipo de glucosídico. El color de la mayoría de las frutas es causado por una mezcla compleja de antocianinas. Por ejemplo, se han encontrado 16 antocianinas en cultivos de arándanos; se han reportado 21 componentes de antocianinas en pieles de *V. Vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. Sin embargo, modelos simples de una o dos antocianinas pueden ser detectadas, por ejemplo, frutas de la pasión y duraznos. La cianidina es la antocianina más común en frutas (presente en 90% de las frutas examinadas, seguida por la delfinidina (35%), peonidina (30%), pelargonidina (20%) y petunidina y malvidina (cada una 15%). Estas antocianinas también son predominantes en vegetales y granos.



Figuras 2.8. Imágenes físicas de fuentes de antocianinas: (a). Fresa (*Fragaria mexicana* S.), Zarzamora (*Rubus sp.*), Mora azul (*Vaccinium corymbosum*) y Frambuesa (*Rubus idaeus*). (b). Manzana (*Pyrus malus*), (c). Durazno (*Prunus pérsica*) (d). Ciruela cereza (roja) (e). Ciruela amarilla (*Prunus sp.*), (f). Mango (*Mangifera indica* L.), (g). Arándano (mora azul) (*Vaccinium corymbosum*). (h). Soya (*Glycine max*), (i). Rábano (*Armoracia rusticana*), (j). Camote (*Ipomea batatas* Lam.), (k). Lichi. (*Litchi chinensis*) (l). Berenjena (*Solanum melongena*), (m). Col morada (*Brassica oleracea* var *capitata*), (n). Cebada (*Hordeum vulgare*), (ñ). Zanahoria (*Solanus nigrecens solanáceas*), (o). Tamarindo (*Tamarindus indicus*), (p). Jitomate rojo (*Licopersicum esculentum* Mill). (q). Uva (*Vitis vinifera*), (r). Arándano rojo (*Vaccinium oxycoccus*), (s). Arroz (*Oryza sativa* L.).

La glucosilación en la posición C<sub>3</sub> es muy común. Diglucósidos son formados por enlace de azúcares en dos hidroxilos diferentes (generalmente C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub> ó C<sub>7</sub>) o por enlace de dos azúcares en una sola posición (C<sub>3</sub>). Los triglicósidos no son muy numerosos en frutas. Antocianinas aciladas son a menudo ampliamente encontradas en frutas, por ejemplo en uvas, berenjena y arándano, y en vegetales (col morada, rábano, apio, chicoria, papa). Sin embargo, ellas rara vez están presentes en granos (maíz). El contenido total de antocianinas de diferentes tejidos de plantas puede mostrar diferencias considerables. Por ejemplo, en frutas éste promedia de 0.25 mg/100g (pera) a 760 mg/100 g (*Vaccinium ellioti*), cultivos rojos de grosella varía de 11.9 a 18.6 mg/100 g, cultivos de arándanos varía de 46 a 172 mg/100 g. La distribución y contenidos de pigmentos antociánicos en frutas, vegetales y granos han sido comprensivamente resumidos en la Tabla 2.3.- (Eder, 1996).

### **2.3.1.1. Frutas y Verduras:**

El estudio de las antocianinas en frutas tropicales, ha tomado fuerza la última década no solo por la capacidad colorante (Garzón, 2008), sino también por su capacidad antioxidante (Cooke, y otros, 2005). Es así como los extractos de distintas frutas como mora, frambuesa y diferentes cultivos de grosella han demostrado actuar de manera eficaz como inhibidores de radicales libres (Kalt, y otros, 1999). Muchas frutas son ricas en antocianinas y en la mayoría de los estudios publicados se ha realizado la identificación y cuantificación de estos pigmentos por HPLC-EM y HPLC-DAD. Mazza y Miniati han publicado una extensa revisión sobre antocianinas en frutas tropicales hasta el año 1987 encontrando cerca de 20 compuestos responsables del color rojo en frutas (Mazza y Miniati, 1993). Durante los últimos años se ha publicado la composición de los pigmentos de una gran variedad de plantas de diferente origen geográfico, de diferentes familias y con diferentes métodos de extracción (Cabrita, y otros, 2000) y (Miller y otros, 1997). En un estudio por (De Brito y otros, 2007), se realizó la identificación y cuantificación de antocianinas en algunas frutas tropicales por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, con el fin de demostrar la presencia de antocianinas en dichas frutas.

Se encontraron antocianinas como cianidina, delphinidina, pelargonidina, petunidina y malvidina en cantidades apreciables (75 mg/100g y 275 mg/100g peso seco). Por otro lado (Vasco, 2007) realizó una investigación en algunos frutos ecuatorianos para identificar y cuantificar los compuestos fenólicos responsables de la actividad antioxidante en estos frutos, se estudiaron tres pertenecientes a la familia de las *Rosaceas* (mora andina, fresa y ciruela capulí), otra especie de la familia *Ertcaceae* (mortiño) y tres frutas de la familia *Passifloraceae*. Entre los compuestos fenólicos encontrados, la antocianina cianidina estuvo presente en todos los frutos, la delphinidina solo encontró en el mortiño y la pelargonidina en la fresa. Recientemente se han publicado varios estudios dedicados a la búsqueda de nuevas fuentes vegetales ricas en antocianinas (Tabla 2.3.-), entre las cuales se encuentran uvas, col morada, aceitunas, grosellas, manzanas, fresas, ciruelas y cerezas, entre otras. En general el contenido total de antocianinas en frutas puede estar entre 20 y 100 mg/100g de fruta fresca. En algunos estudios la cuantificación se realizó por HPLC usando el método de estándar externo en la respuesta de compuestos patrón; pero también se ha utilizado el método de pH diferencial (Giusti, y otros, 2001), para la obtención de la concentración de las antocianinas.

Este método se basa en las transformaciones reversibles que sufren las antocianinas con los cambios de pH, manifestado por un cambio en la absorbancia. La forma oxonium predomina a pH 1 y el hemiacetal a pH 4.5.

**Tabla 2.3.- Contenido de Antocianos en alimentos.**

<b>PRODUCTO</b>	<b>Contenido de antocianinas (mg/kg)</b>
Mora	1.1
Arándano azul	4.2 - 825.0
Cereza	4.5 - 20.0
Grosella	1.3 - 4.0
Uva	300.0 - 7500.0
Ciruela	20.0 - 250.0
Frambuesa negra	1.7 - 4.2
Frambuesa roja	100.0 - 600.0
Fresa	150.0 - 350.0
Repollo morado	250.0
Vino tinto	240.0 - 350.0
Arándano	2.0 - 600.0
Berenjena	7.5

(Clifford, 2000).

Así por ejemplo, (Kahkonen, y otros, 2003), determinaron cuantitativamente los compuestos fenólicos por HPLC, presentes en algunas especies de arándano (*Vaccinium myrtillus*), arándano rojo (*Vaccinium vitis-idaea*) y grosello negro (*Ribes nigrum*), encontrando que el mayor contenido de antocianinas de las bayas que se consumen en Finlandia se encuentra en los arándanos (300-600 mg/100 de peso fresco) y en el grosellero negro (80 a 810 mg/100g). Otras bayas oscuras, tales como las moras azules (*Empetrum nigrum L.*) tienen un contenido de antocianinas en el intervalo de 300-560 mg/100g.

### **2.3.1.2. Cereal (Maíz morado):**

*Zea mays* es una gramínea anual originaria de América introducida en Europa en el siglo XVI pero actualmente es el cereal con mayor volumen de producción en el mundo, superando al trigo y el arroz. En la mayoría de los países de América, el maíz constituye la base histórica de la alimentación regional y uno de los aspectos centrales de la cultura mesoamericana. El uso principal del maíz es alimentario, puede cocinarse entero, desgranado (como ingrediente de ensaladas, sopas y otras comidas. La harina de maíz (polenta) puede cocinarse sola o emplearse como ingrediente de otras recetas, sin embargo, el aceite de maíz es uno de los más económicos y es muy usado para freír alimentos (Maltos, 1998). Existen estudios cuantitativos sobre el contenido de antocianinas en maíces pigmentados. (Espinosa-García, 2003), reportó la concentración total de antocianinas (mg/kg) en distintas razas de maíces de grano pigmentado cultivados en nuestro país (Ver Tabla 2.4.-). En la Figura 2.9. se muestra la gran variedad de coloraciones del maíz (*Zea mays*), pero en el caso del maíz morado, es una variedad que posee la coronta y los granos de color morado y es originario del altiplano andino (Bolivia y Perú), donde se utiliza en la elaboración de bebidas “Chicha morada”, mazamoras y otros alimentos (Escribano-Bailon, y otros, 2004). Contiene diferentes tipos de antocianinas, siendo la cianidina-3- $\beta$ -glucósido, su pigmento mayoritario el cual es un importante antioxidante (FAO, 2006). (Ver Tabla 2.5.-).

El maíz morado es uno de los cereales donde la composición de antocianinas ha sido definida por estudios de espectroscopía de masas (LC-DAS-MS),  $H^1$  Y  $C^{13}$  RMN bidimensional homo y heteronuclear, HSCCC Y HPLC-MS, el estudio de componentes

desarrollado por (Pascual-Teresa y Rivas, 2002) y (Schewartz y otros, 2003) de un extracto comercial de corontas de maíz morado revela la presencia de un dímero y derivados mono y di-glicosilados de cianidina, pelargonidina y peonidina.

(Ver Tabla 2.6.-).

**2.4.- Ficha técnica del Maíz (*Zea mays*.)**

Reino	Plantae
Subclase	Monocotiledonea
Familia	Gramineas (Gramineae)
Nombre científico (género y especie)	<i>Zea mays</i> .
Orden	Cereales
Clase	Angiosperma

**Tabla 2.5.- Contenido total de antocianinas en razas de maíces de grano pigmentado.**

Origen del grano de maíz pigmentado	Raza primaria	Ubicación del Pigmento	Color	Concentración final de antocianinas (mg/kg)
México	Cónico	Capa de aleurona	Azul	144.34
Puebla	Arrocillo	Capa de aleurona	Azul	117.58
Oaxaca	Bolita	Capa de aleurona	Azul	109.28
Nayarit	Elotes oc.	Capa de aleurona	Azul	104.78
Durango	Bofo	Capa de aleurona	Azul	100.98
Puebla	Arrocillo	Capa de aleurona	Azul	100.35
Guerrero	Conejo	Capa de aleurona	Azul	99.42
Puebla	Elotes cónicos	Capa de aleurona	Azul	98.81
Chiapas	Tuxpeño	Capa de aleurona	Azul	84.14
Morelos	Pepitilla	Capa aleurona	Rojo	80.00
Chiapas	Chiquito	Capa de aleurona	Rojo	51.92
Puebla	Elotes cónicos	Pericarpio y C. aleurona	Rojo	141.70
Nayarit	Bofo	Pericarpio y C. aleurona	Rojo	113.51
México	Cónico	Pericarpio y C. aleurona	Rojo	76.87
Oaxaca	Bolita	Capa de aleurona	Rojo	75.52
Durango	Elotes oc.	Capa de aleurona	Rojo	69.94
-	Palomero	Pericarpio y C. aleurona	Rojo	59.07
Durango	Cónico corteño	Pericarpio y C. aleurona	Rojo	46.69
Quintana R.	Tuxpeño	Pericarpio	Rojo	40.41
Morelos	Pepitilla	Capa de aleurona	Rojo	30.69
Morelos	Ancho	Capa de aleurona	Rojo	30.22
Puebla	Arrocillo	Pericarpio	Guinda	95.02
S. L. P.	Olotillo	Capa de aleurona	Morado	49.95
Yucatán	Dzit bacal	Capa de aleurona	Morado	32.14
Quintana R.	Nal. Tel.	Pericarpio	Naranja	10.13
Sinaloa	Chapalote	Pericarpio	Café	6.84
Guanajuato	Dulce	Pericarpio	Naranja	6.39
Guerrero	Tabloncillo	Pericarpio	Naranja	4.81

(Espinosa-García, 2003).



Figura 2.9. Variedad de coloración en el maíz (*Zea mays* L.).

Los dobles enlaces deslocalizados en estos polifenoles y la presencia de estos compuestos fenólicos en las corontas de maíz morado determinan una serie de propiedades que fueron demostradas y que convierten a las antocianinas en fuentes potenciales de colorantes naturales, y sustancias activas de alimentos funcionales, nutraceuticos y medicamentos.

Tabla 2.6.- Componentes de un extracto comercial de antocianinas de corontas de Maíz morado.

Pico	Compuesto	R <sub>f</sub>	[M] <sup>+</sup>	Fragmentos [M+H] <sup>+</sup>	AR (%)
1	Dímero <sup>a</sup>	14,0	899	737; 575; 423	1,8
2	Cianidina-3-glucósido	28,8	449	287	54,3
3	Pelargonidina-3-glucósido	34,8	433	271	6,1
4	Peonidina-3-glucósido	37,2	463	301	14,7
5	Cianidina-3-(6''-malonilglucósido)	39,8	535	449; 287	11,6
6	Pelargonidina-3-(6''-malonilglucósido)	42,3	519	433; 271	3
7	Peonidina-3-(6''-malonilglucósido)	43,2	549	463; 301	5,5
8	Cianidina-3-(6''-etilmalonilglucósido)	47,7	563	449; 287	2,6
9	Pelargonidina-3-(6''-etilmalonilglucósido)	48,9	547	433; 271	0,2
10	Peonidina-3-(6''-etilmalonilglucósido)	49,5	577	463; 301	0,1

<sup>a</sup>: Dímero formado por la condensación directa de un flavan-3-ol y cianidina-3.5-diglucosido, AR: Abundancia relativa. (Pascual-Teresa y Rivas, 2002).

En general, hay una enorme variedad de antocianinas distribuidas en la naturaleza siendo la principal diferencia entre ellas el número de grupos hidroxilados, el grado de

metilación de estos grupos hidroxilo y su naturaleza, el número y posición de los azúcares unidos a la estructura. Hoy en día se reportan 23 antocianidinas y más de 500 diferentes antocianinas, de las cuales solo seis son las más comunes en las plantas: Cianidina, Pelargonidina, Peonidina, Delfinina, Petunidina y Malvidina (Castañeda-Ovando, 2009). (Ver Tabla 2.8.-). La cianidina, pelargonidina y la delfinina son las más comunes en hojas pigmentadas en un 80%, en frutas con el 69% y con 50% en las flores. La distribución dentro de las frutas y vegetales es 50% de cianidina, 12% de delfinina, 12% de pelargonidina, 12% de peonidina, 7% de petunidina y 7% de malvidina. (Ver Figura 2.10.). Como ya se ha mencionado las antocianinas son derivados del catión 2-fenilbenzopirilio y debido a la poca solubilidad de éstas en agua, no se encuentran de manera libre en la naturaleza, si no en su forma glucosilada siendo una de las más abundantes la cianidina-3-glucosido (Walford, 1980). (Ver Figura 2.11.).

**Tabla 2.7.- Clasificación estructural de antocianinas y el color que proporcionan a los tejidos de las plantas.**

Nombre	Abreviación	Modelo de sustitución (ver Figura 6)							Color
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	
Apigenidina	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	Azul-rojo
Arrabidina	Ab	H	H	OH	OH	H	OH	OMe	
Aurantidinina	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	
Capensinidina	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	
Carajurina	Cj	H	H	OH	OH	H	OMe	OMe	
Cianidina	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	
Delfinidina	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	
Europinidina	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	
Hirsutidina	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	
3'-HidroxiAb	3'OHAb	H	H	OH	OH	OH	OH	OMe	
6-HidroxiCy	6OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	
6-HidroxiDp	6OHDp	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	
6-HidroxiPg	6OHPg	H	OH	OH	OH	H	OH	H	
Luteolina	Lt	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	
Malvidina	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	
5-MetilCy	5-MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	
Pelargonidina	Pg	OH	OH	H	OH	H	OH	H	
Peonidina	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	
Petunidina	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	
Pulquelidina	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	
Riconidina A	RiA	OH	H	OH	OH	H	OH	H	
Rosinidina	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	
Tricetinidina	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	

(Castañeda-Ovando, 2009); (Kong, 2003) y (Andersen, 2006).



Las especies del género *Rubus* se han descrito como fuentes naturales de antocianinas, como son la cianidina-3-glucósido y en algunos casos glucósidos de pelargonidina (Deighton, 2000), diversos estudios reportan que su contenido va de 10 a 600 mg/100 g de peso fresco. (Ver Tabla 2.7.-).

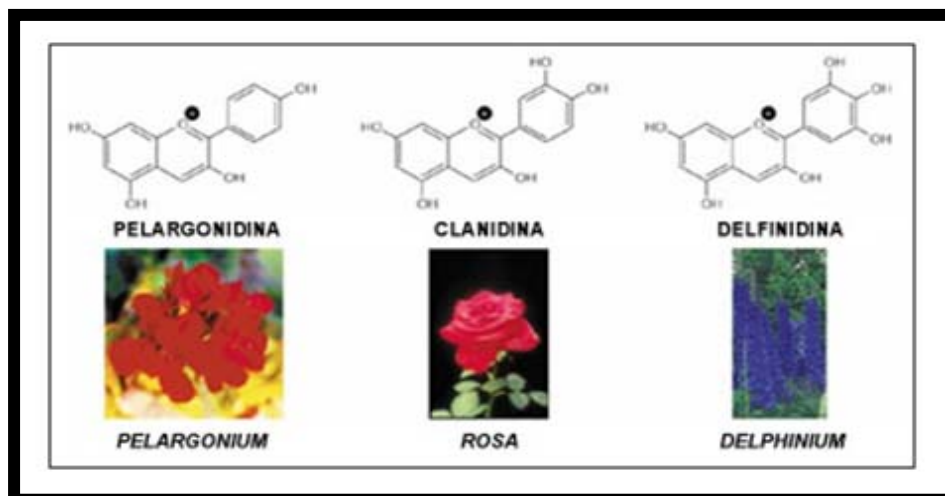


Figura 2.10. Pelargonidina, Cianidina y Delfinidina presentes en los géneros *Geranium*, *Rosa* y *Delphinium*, respectivamente.

Tabla 2.8.- Contenido de antocianinas en diferentes especies de bayas (mg/100 g peso fresco)

Bayas	Género	Antocianinas
Zarzamora	<i>Rubus spp</i>	131-256 <sup>2</sup>
Grosella negra	<i>Ribes nigrum</i> , L.	80-812 <sup>3</sup>
Mora azul	<i>Vaccinium</i> (diferentes subgéneros)	60-480 <sup>3</sup>
Arándano	<i>Vaccinium oxycoccus</i> , L.	20-360 <sup>3</sup>
Arándano americano	<i>Vaccinium myrtillus</i> , L.	300-600 <sup>3</sup>
Arándano rojo	<i>Vaccinium vitisidaea</i> , L.	35-170 <sup>3</sup>
Frambuesa	<i>Rubus idaeus</i> , L.	20-220 <sup>3</sup>
Fresa	<i>Fragaria ananassa</i>	10-80 <sup>3</sup>

<sup>2</sup> (Siriwoham, 2004)

<sup>3</sup> (Rein, 2005)

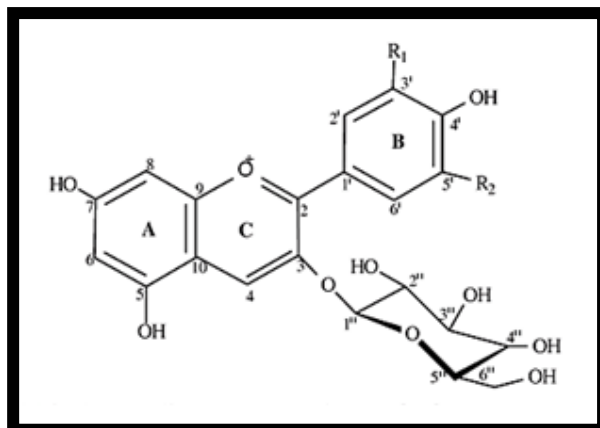


Figura 2.11. Estructura química de los antocianos. Dp (1, R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=OH); Cy 3-glu (3, R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=OH); Pg 3-glu (5, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H); Pn 3-glu (6, R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=H); Mv 3-glu (7, R<sub>1</sub>=OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>).

#### 2.4. Propiedades Biológicas de las Antocianinas:

Las antocianinas poseen conocidas propiedades farmacológicas utilizadas para la terapia de un amplio espectro de enfermedades. Las investigaciones realizadas con extractos de *Vitis vinifera* ricos en antocianinas, han demostrado que disminuyen la fragilidad y permeabilidad capilar; también efectos antiinflamatorios y actividad antiedema. Además tienen la propiedad de proteger los vasos sanguíneos del daño ocasionado por los altos niveles de azúcar en la diabetes (Wagner, 1982). Las antocianinas protegen de muchas maneras. Primero, neutralizan las enzimas que destruyen el tejido conectivo. Segundo, su capacidad antioxidante previene los oxidantes del tejido conectivo dañado. Finalmente reparan proteínas dañadas en las paredes de los vasos sanguíneos. Experimentos en animales han demostrado que la suplementación con antocianinas previenen efectivamente la inflamación y el subsecuente daño a vasos a sanguíneos. Esta habilidad antiinflamatoria de las antocianinas también ayuda contra reacciones alérgicas.

Por otro lado, se ha observado que su potencial antioxidante va en contra de radicales superóxidos y peróxidos de hidrógeno a través de numerosos mecanismos, por ejemplo: la cianidina: Protege la membrana celular de lípidos de la oxidación por una variedad de sustancias peligrosas. La cianidina es un antioxidante cuatro veces más fuerte que la vitamina E. La pelargonidina protege el radical amino de la tirosina del peroxinitrilo, un antioxidante alternativo reactivo. Por otro lado, la delphinidina interfiere con el radical hidroxil, uno de los oxidantes del cuerpo humano (Wrolstad, 2001).

La capacidad antioxidante se relaciona con el número de grupos –OH que presenten y el lugar de la sustitución. Cuando se ingieren, las antocianinas son destruidas en parte por la flora intestinal y las que son absorbidas se eliminan por la orina y la bilis, con previas transformaciones. Gracias a esta capacidad antioxidante, las antocianinas son catalogadas como ingredientes funcionales. Varios trabajos reportan sus efectos benéficos al prevenir la proliferación de células cancerígenas, protección contra enfermedades del corazón y prevención del daño a lípidos de alimentos. Debido al interés de la sustitución de los colorantes sintéticos por su posible toxicidad, se han buscado nuevas fuentes de colores naturales, como las antocianinas presentes en los maíces pigmentados.

### **2.4.1. Actividad Antioxidante de las Antocianinas:**

Los antioxidantes naturales son principalmente compuestos fenólicos que pueden estar presentes en todas las partes de la planta (Shahidi, y otros, 1995). Estudios realizados con compuestos polifenólicos y especialmente flavonoides demuestran su capacidad antioxidante y su significativa contribución a la dieta, así como su efecto en la prevención de diversas enfermedades tales como: enfermedades cardiovasculares, cancerígenas y enfermedades neurológicas (Harborne, y otros, 2001) y (Lapidot, y otros, 1999). Los polifenoles son efectivos donadores de hidrogeno, particularmente los flavonoides. Su potencial antioxidante es dependiente del número y de la posición de los grupos hidroxilos y su conjugación, así como la presencia de electrones donadores en el anillo estructural (Miller, y otros, 1997), debido a la capacidad que posee el grupo aromático de soportar el desapareamiento de electrones por desplazamiento del sistema de electrones  $\pi$ . Las antocianinas, tienen una estructura química adecuada para actuar como antioxidantes, pueden donar hidrógenos, o electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazados en su estructura aromática (Wang, y otros, 1997).

Una actividad antioxidante óptima se relaciona con la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 3' y 4' del anillo B, los cuales confieren una elevada estabilidad al radical formado (Harborne, y otros, 2001). Los grupos hidroxilos libres en las posiciones 3 del anillo C y en la posición 5 del anillo A, junto con el grupo carbonilo en la posición 4 son donadores de electrones (Rice-Evans, y otros, 1996).

Generalmente para grupos de compuestos con estructuras similares todos los métodos siguen las mismas tendencias en cuanto a su actividad antioxidante. Para los derivados del ácido benzoico o cinámico, un incremento en el número de grupos hidroxilo promueve una mayor actividad antioxidante. Compuestos con tres grupos hidroxilo sobre el anillo fenólico o ácidos fenólicos o el anillo B de los flavonoides tienen alta actividad antioxidante. La pérdida de un grupo hidroxilo disminuye la actividad ligeramente, mientras que la pérdida de dos la disminuye significativamente. (Dziedzic y otros, 1983), reportan que se requieren al menos dos grupos hidroxilo para tener actividad antioxidante. (Pratt y otros, 1990), observaron que los 3-glicósidos de flavonoides pueden poseer la misma o algunas veces menor actividad que sus correspondientes agliconas. (Wang y otros, 1997), examinaron la actividad antioxidante de varias antocianidinas/antocianinas usando el ensayo de *ORAC*<sup>4</sup>, no encontrando tendencias consistentes entre la actividad y la glicosilación para estos compuestos.

La estabilidad de las antocianidinas/antocianinas es fuertemente afectada por el pH, la temperatura y las diferentes condiciones utilizadas en cada prueba. Muchos de los flavonoides incluyendo algunas antocianinas y antocianidinas tienen actividad antioxidante similar a las de los antioxidantes sintéticos. (Fukumoto y otros, 2000), consideran que las antocianinas son pigmentos fisiológicamente activos y/o promotores de la salud debido a su papel en la prevención del riesgo de padecer enfermedades crónicas lo cual ha sido documentado. Los flavonoides y compuestos fenólicos están inversamente asociados con el riesgo de padecer enfermedades coronarias-cardíacas, cáncer, la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y liposomas. Se ha encontrado además que las antocianinas también inhiben la oxidación de las LDL y liposomas y previenen el riesgo de varias enfermedades crónicas (Abdel-Aal y otros, 2003).

---

<sup>4</sup> Oxygen Radical Absorbance Capacity: Es una prueba estandarizada adoptada por el Departamento Federal de Agricultura de Norteamérica para medir el Potencial Antioxidante total de alimentos y suplementos nutricionales.

## 2.5. Propiedades Químicas de las Antocianinas:

Como con la mayoría de los colorantes naturales, las antocianinas sufren de inestabilidad inherente; es decir, son compuestos lábiles y su estabilidad es muy variable en función de su estructura y la composición de la matriz en la que se encuentran (Delgado-Vargas y Paredes-Lopez, 2003).

Su estabilidad se ve afectada por el pH, temperaturas de almacenamiento, presencia de enzimas, luz, oxígeno, estructura y concentración de antocianinas y la presencia de otros compuestos tales como otros flavonoides, proteínas y minerales. Uno de los principales factores del medio que afecta la estabilidad del color de las antocianinas es el pH. Generalmente, las antocianinas son más estables bajo condiciones ácidas, libres de oxígeno bajo condiciones frías y en oscuridad (Eder, 1996) pero pueden degradarse por alguno de varios posibles mecanismos para formar primero productos incoloros, después productos oscuros e insolubles. Estos compuestos también cambian de color cuando forman complejos, quelatos o sales con iones de sodio, potasio, calcio, magnesio, estaño, hierro o aluminio ya que se favorece un desplazamiento de la absorción a longitudes de onda mayores; por esta razón, se recomienda que las latas que se empleen para los alimentos que contengan antocianinas, sean recubiertas por una laca protectora que evite el desprendimiento de los metales indeseables (Badui, 1999). Por otro lado, debido a la deficiencia electrónica del núcleo flavilio, las antocianidinas tienden a reacciones que alteran su estructura (Harborne, y otros, 2001). Su estabilidad incrementa a mayor número de grupos metóxilos en el anillo B y decrece a mayor cantidad de grupos hidroxilos en la molécula. Según (Kong y otros, 2003) y (Zhang y otros, 2001), el orden de estabilidad de las antocianidinas es  $Df < Pg < Cy < Pt < Pn < Mv$ <sup>5</sup>. Cuando la molécula es glucosilada o acilada su estabilidad también incrementa, así, los diglucósidos son más estables que su correspondiente monoglucósido (Harborne, y otros, 2001) y (Tomas-Barberán, y otros, 2000).

Como ya se mencionó anteriormente, este núcleo flavilio de los pigmentos de antocianina que es deficiente en electrones, es por tanto, muy reactivo, lo que favorece reacciones ordinarias que comprenden la decoloración de los pigmentos y son casi siempre no deseables en el procesado de frutas y hortalizas (Fennema, 1993).

---

<sup>5</sup> Df: Delfinidina, Pg: Pelargonidina, Cy: Cianidina, Pt: Petunidina, Pn: Peonidina y Mv: Malvidina

## 2.5.1. Efecto del pH y la Temperatura en Antocianinas:

- pH:

Las antocianinas son compuestos cromóforos al igual que los carotenos y las xantofilas. Tales compuestos al tener estructuras resonantes tienen conjugación electrónica, lo cual aumenta a medida la molécula tiene grupos sustituyentes con pares de electrones no compartidos. A partir de esto se generan alteraciones en la configuración electrónica que provocan cambios en la forma de la molécula y por ende un desplazamiento de la máxima absorbancia en el espectro ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) (Wong, 1995). Bajo condiciones ácidas el color de antocianinas no- y monoaciladas está determinado en gran parte por la sustitución en el anillo B de la aglicona (Ver Figura 2.5.). Un incremento en la sustitución de hidroxilos origina un color azul, mientras que la metoxilación causa que los cromóforos lleguen a ser más rojos. Así, extractos acuosos conteniendo principalmente glucósidos de pelargonidina y/o cianidina aparecen con coloraciones naranja- rojo, aquellas con glucósidos de peonidina son rojo profundo, y aquellas conteniendo glucósidos de delfinidina, petunidina y/o malvidina exhiben coloraciones azulada-rojiza. La glucosilación y la acilación de antocianinas generalmente tienen un efecto azulado (Jackman, y otros, 1992). Como ya se mencionó antes, las antocianinas sufren transformaciones estructurales en medios acuosos que son dependientes del pH. Han sido encontradas cuatro formas de antocianinas que existen en equilibrio: el catión rojo flavilium, la base azul quinoidal, la pseudobase incolora carbinol y el chalcón incoloro como se muestra en la Figura 2.13. En medios fuertemente ácidos (valores de pH debajo de 2) las antocianinas existen predominantemente en su forma roja coloreada como cationes flavilium. A valores de pH débilmente ácidos, neutros y básicos el carbinol y las formas de base quinoidal dominan el catión flavilium, así que el color antociánico es también llevado a cabo por la reacción de antocianinas conteniendo grupos orto-dihidroxi con  $\text{AlCl}_3$  a valores de pH 2-4 (cambio batocrómico) y por medio de la formación de complejos antocianina-flavonol (copigmentación) (Eder, 1996), (Ver Figura 2.14.). Por esta razón, las antocianinas se degradan más rápido a pH altos que bajos. La misma razón justifica por qué los picos cromatográficos tienen menos resolución a más alto el pH, lo cual se explica por la formación de derivados del catión flavilio (base quinoidal, chalconas y base carbinol) interfiriendo en la absorbancia a 520 nm (longitud de onda más usada para identificar antocianinas).

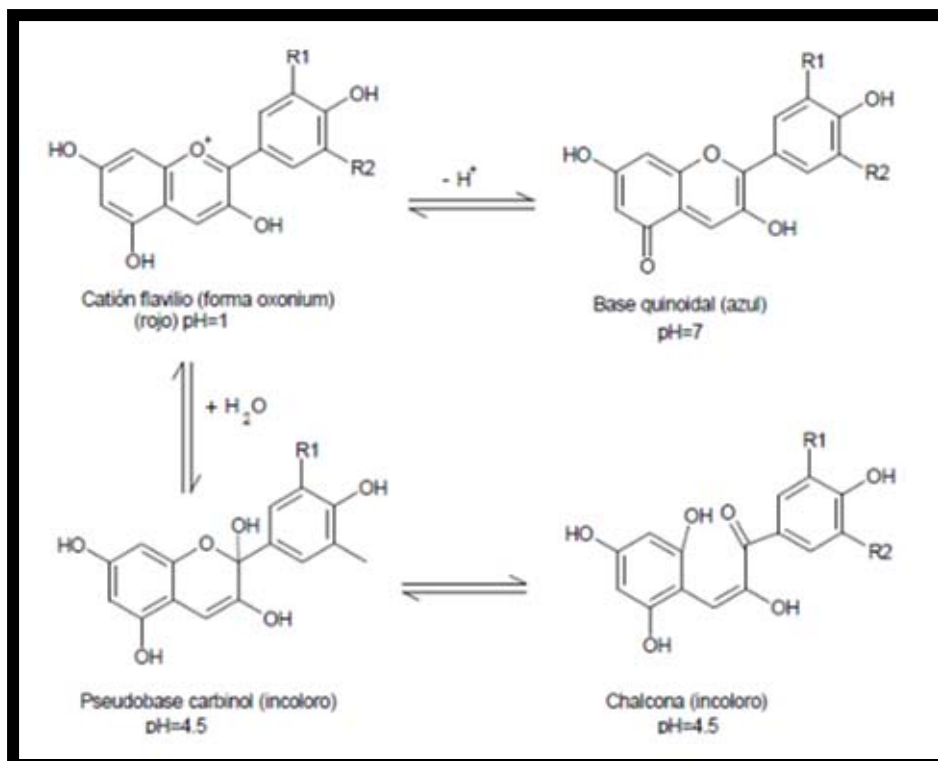


Figura 2.12. Cambios en la estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH (Gould, y otros, 2009).

El porcentaje presente en forma de base quinoidal (A) es muy pequeño en la mezcla en equilibrio a cualquier pH. En soluciones muy ácidas (pH = 0,5) la especie  $AH^+$ , de color rojo, es la única que se encuentra en solución (Wong, 1995).

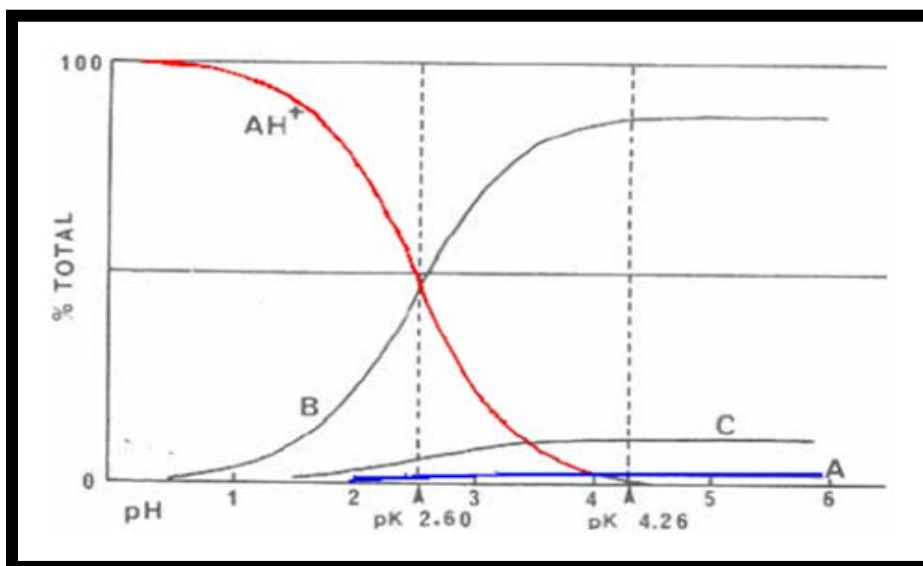


Figura 2.13. Distribución de las estructuras de antocianinas en función del pH. Malvidina 3-glucósido; a 25°C.  $AH^+$  = catión flavilio rojo, B = base carbinol incolora, C = chalcona incolora, A = base quinoidal azul (Wong, 1995).

Como las antocianinas tienen un gran cromóforo de ocho dobles enlaces conjugados aparecen fuertemente coloreados en un medio ácido. Sus espectros de absorción están caracterizados por dos bandas separadas— una en la región visible entre 465 y 550 nm y la segunda, la cual es menos intensa, en el intervalo UV entre 270 y 280 nm por tanto la pérdida de color a medida que el pH aumenta, puede ser monitoreada midiendo el espectro de absorción del pigmento con un espectrofotómetro. Estos pigmentos funcionan como verdaderos indicadores de pH; es decir, su color depende de las condiciones de acidez o alcalinidad del sistema en que se encuentran.

- **Temperatura:**

Como con la mayoría de las reacciones químicas la estabilidad de las antocianinas y la velocidad de su degradación, en forma natural y en sistemas modelo, es notablemente influenciada por la temperatura. En general, comportamientos estructurales que conducen a incrementar la estabilidad al pH, también conducen a incrementar la estabilidad térmica, por ejemplo, la hidroxilación de la aglicona decrece la estabilidad, mientras que la metoxilación, glucosilación y acilación tienen el efecto opuesto (Jackman, y otros, 1992). En presencia de oxígeno, la máxima estabilidad térmica de la antocianidina 3-glucósido ha sido observada a un pH de 1.8 a 2.0 (Daravingas, y otros, 1968); (Jackman, y otros, 1992), mientras que la de la antocianidina 3,5-diglucósido ha sido observada a un pH de 4.0 a 5.0. La degradación de la antocianina es virtualmente independiente del pH a un pH de 2.0 a 4.5 en ausencia de oxígeno (Jackman, y otros, 1992).

Con respecto a la temperatura, también (Dao, 1998), observó que las agliconas delfinidina, petunidina y malvidina, en una solución de metanol acidificado desaparecieron completamente luego de 48 h a temperatura ambiente y luego de cuatro días en refrigeración (4°C). Ese mismo autor observó, sin embargo, que cuando las antocianidinas permanecen retenidas en un cartucho C18 su estabilidad incrementó considerablemente manteniéndose constante luego de 7 días a temperatura ambiente. Cuando se realizan tratamientos térmicos éstos influyen significativamente en la destrucción de las antocianinas; es así como se ha visto que en las fresas por ejemplo se presenta una relación logarítmica entre la pérdida de color y la temperatura.



Dada su alta hidrosolubilidad, estos pigmentos se pueden perder fácilmente también por lixiviación en el agua que se utiliza en los diferentes tratamientos; a medida que aumenta la temperatura se acelera la decoloración de la fruta, ya que se favorece tanto la extracción que incluso puede llegar a obtener productos prácticamente incoloros (Badui, 1999). La degradación puede ocurrir también durante la extracción/purificación y durante el procesamiento y almacenamiento normal de alimentos.

### **2.5.2. Influencia del Oxígeno y la Luz sobre las Antocianinas:**

El oxígeno amplifica el impacto de otros procesos de degradación de las antocianinas. La presencia de oxígeno, en conjunto con altos valores de pH y elevadas temperaturas, es la combinación que provoca mayor inestabilidad a las antocianinas. Este deterioro puede ser debido a un mecanismo directo y/o indirecto de oxidación en el cual la molécula oxidada reacciona con la antocianina provocando un incremento en la pérdida del color o generando oscurecimiento en los productos. También reaccionan en presencia de peróxidos, actuando como antioxidantes (Rein, 2005). La luz afecta a las antocianinas de dos distintas formas. Esta es esencial para la biosíntesis de las antocianinas, pero también acelera su degradación. Las antocianinas preservan su color cuando los productos son guardados en la oscuridad (Markakis, 1982).

### **2.5.3. Copigmentación y Autocopigmentación de las Antocianinas:**

La copigmentación es el fenómeno por medio del cual hace que el color de las antocianinas sea más intenso, brillante y estable debido a la interacción entre sustancias orgánicas y las antocianinas; además las protegen de la degradación de la luz, calor, pH (Markakis, 1982). Algunas moléculas capaces de actuar como pigmentos son: flavonoides, polifenoles, alcaloides, aminoácidos y antocianinas (autoasociación) (Mazza y Miniati, 1993). La copigmentación es usual en la naturaleza y contribuye a la profusión de colores en las flores y algunos tejidos. Abe y otros en 1977, propusieron el término copigmentación intermolecular para la asociación débil de antocianinas con compuestos, modificando así el color y la estabilidad del complejo formado; y “copigmentación

Intramolecular para el enlace fuerte que forman grupos de ácidos orgánicos con las antocianinas (Markakis, 1982).

La copigmentación intermolecular de antocianinas con otros flavonoides produce un incremento en la absorbancia a una longitud de onda visible (efecto hiperocrómico); así como un desplazamiento a longitudes de onda mayores del máximo de absorbancia (efecto batocrómico); la copigmentación Intramolecular es la responsable por la estabilidad del color de antocianinas que poseen dos o más grupos acilos aromáticos. El color se intensifica al incrementar el contenido de ácidos orgánicos como el cinámico y malónico (Mazza y Miniati, 1993). Se han propuesto varios tipos de interacciones para generar la copigmentación. El complejo antocianina copigmento se forma por asociación electrostática de las formas roja y azul de la antocianina y se estabilizan por interacción de cargas y puentes de hidrogeno con el copigmento. Por otro lado también hay evidencias que afirman que la copigmentación es una interacción molecular entre las estructuras coloreadas de las antocianinas y el copigmento, o bien, por interacciones hidrofobicas del núcleo aromático de las antocianinas y el copigmento (Mazza y Miniati, 1993).

Un fenómeno relacionado con la copigmentación, que también se da en soluciones acuosas concentradas, es el de la autoasociación o autocopigmentación, en donde los pigmentos forman agregados o apilamientos con ellos mismos. En estudios sobre los equilibrios de los antocianos (Asen y otros, 1972), trabajando con soluciones de cianidina-3.5-diglucósido, sin la presencia de copigmentos, había notado que estos no obedecían la ley de Beer salvo a muy altas diluciones. Esto demostró que el color de los antocianos no solo era dependiente del pH del medio acuoso, si no de la propia concentración del pigmento. Este efecto fue atribuido a la autoasociación por Asen y otros en 1972. Estudios posteriores demostraron que tanto el flavilium como la base quinoidal, coloreados, podían formar apilamientos entre la parte cromófora de la molécula y la porción glicosídica (Ver Figura 2.15.). Esta disposición es hidrófoba y evita la hidratación y consecuentemente pérdida de color del anillo pirilio (Hoshino, 1991). La autoasociación ha sido encontrada en soluciones modelo conteniendo etanol, pero en menor medida que en soluciones acuosas (Mazza y otros, 1995) por lo que en su rol en el vino por ejemplo ha recibido poca atención.

Algunas variedades de uva como *Pinot Noir*, carecen antocianos acilados y tienen una menor capacidad para formar compuestos de autoasociación.

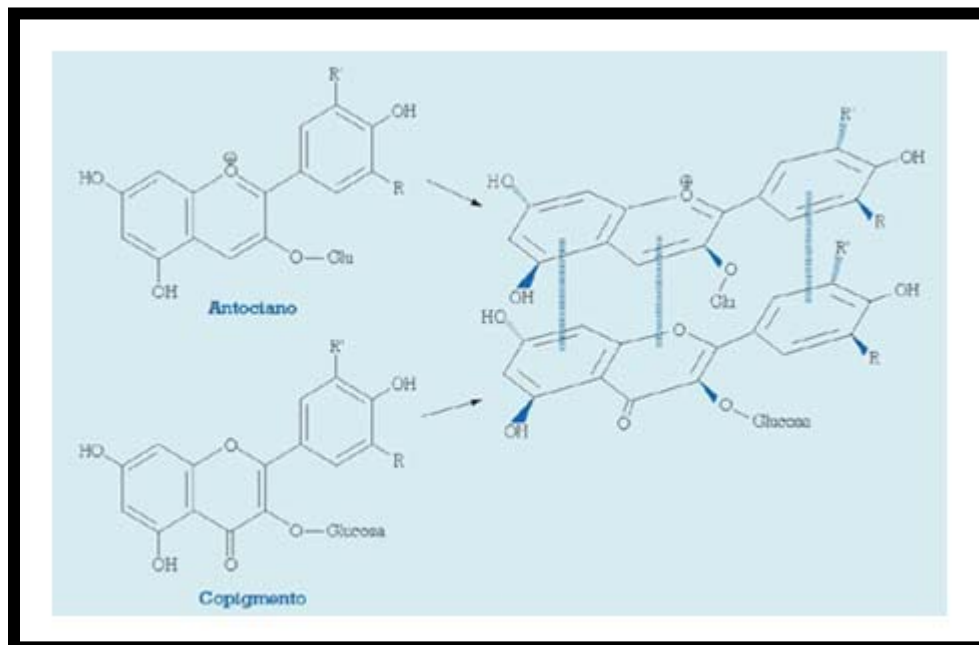


Figura 2.14. Formación de un complejo de copigmentación a partir de un pigmento (antociano monómero en su forma de catión flavilio) y de un copigmento (flavonol).

## 2.6. Extracción y Purificación de Antocianinas:

Como las antocianinas son descompuestas en soluciones neutras o alcalinas, los procedimientos de extracción generalmente involucran el uso de ácidos diluidos en solventes polares siendo este procedimiento el primer paso para su determinación total e individual en cualquier tipo de tejido vegetal. El procedimiento de extracción más común involucra la maceración o remojo del material de la planta o fruto en metanol conteniendo una pequeña cantidad de HCl (1%). La acidificación con ácidos fuertes como el HCl sirve para mantener un pH bajo. Esto puede, sin embargo, alterar la forma nativa de pigmentos complejos por asociaciones de rompimiento con metales, copigmentos y proteínas; es decir, se previene la degradación de los pigmentos antocianidinícos no acilados (Choung, 2004); (Awika, 2004) y (Wong, 1995). Por otro lado, para obtener antocianinas lo más naturalmente posible el uso de disolventes neutros (metanol, etilenglicol, n-butanol, acetona) y ácidos orgánicos débiles (ácido fórmico y ácido acético) han sido recomendados como sistemas de extracción (Eder, 1996). Las condiciones de extracción, el tipo de disolvente, la temperatura y el tiempo de

exposición que reportan (Giusti y Wrolstad, 1996), pueden ser moduladas en orden para producir pigmentos de alta calidad y reducir la pérdida durante la producción.

La duración de la extracción y el número de procedimientos de reextracción afectaran la recuperación y pureza de antocianinas deberá ser también considerada para la producción del colorante; por tanto, los métodos convencionales empleados para la extracción de antocianinas implica el uso de disolventes ácidos (Tabla 2.9.-).

**Tabla 2.9.- Métodos de extracción de antocianinas**

<b>Método</b>	<b>Características</b>
<b>0.001% HCl en metanol</b>	Este es el método más efectivo, pero el HCl es corrosivo y el metanol tiene efectos tóxicos en la salud humana.
<b>0.001% HCl en etanol</b>	80% tan efectivo como metanol.
<b>0.001% HCl en agua</b>	27% tan efectivo como el metanol.
<b>Metanol acidificado con ácido cítrico ó acido acético</b>	Este es el más eficiente de los ácidos orgánicos
<b>Agua acidificada con acido acético</b>	En eficiencia es seguido por el acido cítrico, tartárico y clorhídrico
<b>Agua con 1000 ppm de SO<sub>2</sub></b>	La extracción es mejor que la obtenida por el uso de la extracción tradicional los cuales implica sistemas de etanol: acido acético: agua

(Delgado-Vargas, y otros, 2000).

Una vez que el proceso de extracción ha concluido, es necesario someter la muestra a un proceso de purificación, con el objetivo de eliminar sustancias como lípidos, carotenos o clorofila que podrían interferir en los posteriores análisis cualitativos y cuantitativos (Buldini, 2002); (Chandra, 2001); (Pascual-Teresa, 2000). Este tipo de métodos de extracción en fase sólida con polivinilpirrolidona (PVP), Sefadex G-25, Sefadex LH-20, poliamida, resinas de intercambio iónico, alúmina acida y octadesilano, están basados en el principio de que las antocianinas son enlazadas en absorbentes; es decir, los grupos hidroxilos libres de las antocianinas son retenidos fuertemente por la matriz de la resina requiriendo gradientes polares para eluir los compuestos fenólicos. De esta manera, (Talcott y otros, 2002) proponen que es una buena técnica para eliminar sustancias de interferencia (compuestos hidrofílicos como azúcares y ciertos ácidos orgánicos) que son retirados mediante lavados de las columnas o cartuchos. En general, las antocianinas son subsecuentemente eluidas del absorbente con metanol acidificado.

## 2.7. Métodos para la Cuantificación de Antocianinas:

### 2.7.1. pH-Diferencial:

Para la obtención de la concentración de antocianinas en un extracto, el método diferencial de pH es la técnica espectrofotométrica más recurrida, tanto por la simplicidad como por el bajo costo que representa. La determinación se basa en la característica química de las antocianinas, ya que éstas experimentan una transformación reversible con cambios de pH del medio en donde se encuentran, manifestándose por un marcado cambio en la coloración. El catión flavilio a pH 1 es la forma más estable, dando un color intenso, mientras que a pH 4.5 las formas hemiacetal predominan, siendo éstas más susceptibles a la degradación. Las antocianinas dan dos bandas de absorción en la región UV (260-280 nm) y la región visible (490-550 nm) (Figura 2.15). Los resultados se expresan como cianidina-3-glucósido. Este método permite una rápida y exacta medida de las antocianinas totales, incluso en presencia de pigmentos degradados (Wrolstad y otros, 2005).

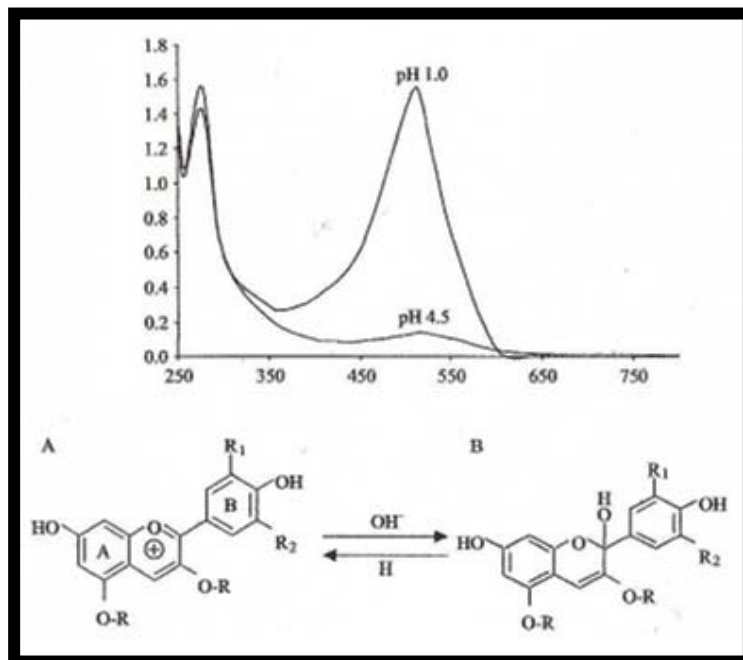


Figura 2.15. Espectro de absorción de las antocianinas con buffer pH 1.0 y 4.5, y las estructuras del catión flavilio (A) y la forma hemiacetal (B). Wrolstad y col., 2005

## 2.7.2. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC):

Desde el trabajo de Mnaley y Shubiak (1975), quienes fueron los primeros en aplicar la HPLC al análisis de antocianinas, numerosas técnicas de HPLC han sido desarrolladas para la separación y cuantificación de antocianinas y antocianidinas. Hoy en día la HPLC ha llegado a ser el método de elección debido a que ofrece la ventaja de ser un método rápido, sensitivo y cuantitativo. La cuantificación de cromatogramas es, sin embargo es y fue complicada para el presente trabajo por la falta de disponibilidad de estándares puros de dichos compuestos.

Aunque en el pasado algunos estándares de antocianinas han estado comercialmente disponibles, en muchos casos el aislamiento preparativo de antocianinas puras es todavía necesario. Dicho de otra manera, esto es una práctica común que solamente un estándar de antocianidina es usado (malvidin 3-glucósido) y que todos los otros picos de antocianinas son cuantificados en contra de este estándar. Como hay diferencias considerables en los valores cuantitativos de absorbancia y la absorción máxima, esta práctica dará ligeramente resultados incorrectos (Eder, 1996).

La separación por HPLC de antocianinas ha sido llevada a cabo casi exclusivamente en columnas C18<sup>6</sup>. Ocasionalmente columnas de sílice enlazadas con octil (C8) y hexil (C6) han sido también usadas. El promedio de diámetro de partícula de los empaques para HPLC es típicamente entre 3 y 10  $\mu\text{m}$ , con 5  $\mu\text{m}$  siendo el más frecuente usado. En la RP-HPLC las antocianinas eluyen de acuerdo a sus polaridades (Delfinidina<Cianidina<Petunidina<Pelargonidina<Peonidina<Malvidina). La elusión de pigmentos es usualmente llevada a cabo por un gradiente de elusión, pero ocasionalmente la elusión isocrática es también suficiente, por ejemplo, con frutas las cuales tienen un medio relativamente simple de antocianina tal como el mango o para la separación de mezclas de antocianinas.

---

<sup>6</sup> Es el tipo de compuesto a base de sílice que sirve de fase inerte dentro de la columna. Aunque las columnas C18 son las más ampliamente utilizadas en HPLC de fase reversa, es importante distinguir entre dos formatos de fase con enlace distinto. El formato C18 de tipo monomérico incorpora enlaces de cadenas alquil C18 a un único átomo de sílice sobre la estructura del gel de sílice. Por otro lado el formato C18 polimérico incorpora un proceso de silanización tri-funcional por el que el grupo octadecil se une a 2 ó 3 átomos de sílice sobre la estructura del gel de sílice. Esto aumenta el efecto de la silanización lo que proporciona una estabilidad de columna mucho mayor, particularmente en condiciones ácidas de la fase móvil. La capacidad de reconocimiento estérico también es mucho mayor que las de las columnas C18 del tipo de silanización monofuncional.

Sistemas de disolventes para análisis de antocianinas por HPLC siempre incluyen un ácido para alcanzar valores bajos de pH ( $< 2.0$ ), el cual asegura que la mayoría de las antocianinas están presentes en forma del catión flavilium.

El ácido fórmico (hasta 10%) es más ampliamente usado. Este es, sin embargo, bastante corrosivo así como el ácido perclórico y el ácido trifluoroacético.

Comúnmente alternativas usadas son el ácido acético 15%, el ácido fosfórico 3-4% y el buffer de fosfatos. Esto debe, sin embargo, ser considerado que el uso prolongado de disolventes más ácidos que pH 2 pudieran resultar en una pobre reproducibilidad y corta vida de uso de la columna debido a la pérdida de fases de enlace de la superficie del soporte de sílica de la fase estacionaria.

El empleo de sílica, columnas poliméricas, las cuales son estables de pH 1 a 13, permite el uso de disolventes con ácidos fuertes, así causando picos más definidos debido a que las antocianinas están completamente en su forma de catión flavilium. Comúnmente el metanol o acetonitrilo es usado como modificador orgánico, pero algunos investigadores sustituyeron acetona por metanol y obtuvieron separaciones similares (Eder, 1996). Las eluciones de antocianinas son monitoreadas con sistemas de detección UV-Vis o matriz de fotiodo. Usualmente la longitud de onda de detección es fijada en el intervalo de entre 510 y 545 nm. Dependiendo de la sensibilidad del sistema detector y del pigmento antocianina, un límite de detección de 0.5-1.0 mg/L de antocianina que puede ser asumido generalmente.

La identificación de antocianinas puede ser llevada a cabo por cromatografía de conocimiento, estándares o basados en tiempos de retención los cuales son comúnmente comparados con datos de la literatura.

Por escaneo del espectro de absorción en línea, detección de matriz de fotiodo hacen una caracterización estructural adicional de posibles pigmentos. Químicamente las antocianinas pueden ser identificadas por hidrólisis ácida y la subsecuente determinación de la antocianidina y el azúcar mayoritario o por una hidrólisis alcalina suave y la subsecuente determinación del componente acil. Además de la elucidación de la estructura, especialmente para antocianinas aciladas, puede ser confirmada por espectrometría de masas de bombardeo rápido de átomos y espectroscopia NMR (Eder, 1996).

Cuando las muestras contienen altas cantidades de material de interferencia (azúcares, coloides, etc...) un procedimiento de limpieza de muestra es recomendado. Una preparación de muestra con cartuchos de extracción de fase sólida (C18) puede ser bastante útil y efectiva. Previo al análisis por HPLC todas las muestras deben ser filtradas a través de un filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  o más pequeño (Eder, 1996).

Durante las últimas dos décadas el análisis por RP-HPLC ha sido exitosamente usado para estudiar antocianinas en numerosos productos alimenticios. Para demostrar el potencial de esta técnica una separación por RP-HPLC de jugo de grosella negra es mostrado en la Figura 2.16. A pesar de los altos costos de adquisición y mantenimiento, la técnica por RP-HPLC probablemente permanecerá como el mejor método calificado para análisis de antocianinas en los siguientes años debido a que esta ofrece, comparada con otros métodos, tiempos de análisis más cortos, mejor selectividad, alta versatilidad y mejor sensibilidad.

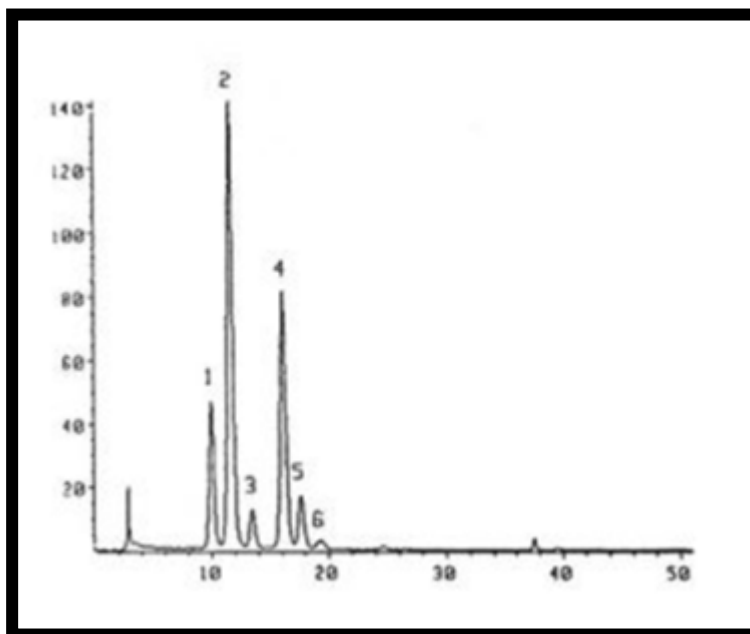


Figura 2.16. Separación por RP-HPLC de jugo de Grosella negra. Picos: 1 = delfinidina 3-glucósido; 2 = delfinidina 3-rutinósido; 3 = cianidina 3-glucósido; 4 = cianidina 3-rutinósido; 5 = pelargonidina 3-glucósido [Int. Std.] ; 6 = pelargonidina 3-rutinósido.



## **2.8. Aplicación de las Antocianinas en Alimentos:**

El contenido y distribución de antocianinas en frutas y vegetales ha sido el objeto de numerosas investigaciones durante el siglo pasado. Los análisis químicos han hecho esto posible de seguir los cambios en la composición de las antocianinas que ocurren durante la maduración, procesamiento y almacenamiento de frutas y para determinar los factores que afectan la estabilidad de estos pigmentos. Estudios quimotaxonómicos han descubierto diferencias cuantitativas y cualitativas en la distribución de antocianinas individuales entre cultivos y variedades. Estos valores encontrados han sido aplicados para la caracterización y verificación de cultivos. Usualmente las variedades difieren solamente en la cantidad relativa de las antocianinas presentes, ya que estas cantidades son determinadas no solamente por la genética sino por factores ambientales, estimaciones estadísticas extensivas son necesarias para la clasificación de variedades.

Los perfiles de antocianinas distintivos han sido una herramienta útil para la detección de adulteraciones en productos de jugos de frutas los cuales son ricos en pigmentos de antocianinas. En vinos rojos el análisis de perfil de antocianinas por HPLC también ha sido usado para clasificaciones geográficas y determinaciones fotométricas de antocianinas han sido aplicadas para medir la edad química. Debido a la historia extensa en el análisis de antocianinas, varias técnicas han sido empleadas para análisis de alimentos (Eder, 1996).

Actualmente, una de las principales aplicaciones de la antocianina (antocianina), un término genérico para colorantes de las uvas, fue para impartir el color al vino. En los Estados Unidos, las bebidas de frutas son el más grande mercado. Los colorantes que contienen antocianinas han sido sugeridos para bebidas, gelatinas, mermeladas, helados, yogur, postres de gelatina, frutas enlatadas, salsa de frutas, dulces y confitería, y rellenos para panadería (Francis, 2000).

La estabilidad de antocianinas de uva adicionadas a una bebida carbonatada fue probada, donde se estudió la estabilidad de estos pigmentos en una bebida no alcohólica carbonatada para lo cual las antocianinas fueron añadidas como colorantes (Palamadis y Markakis, 1975).

Los pigmentos de uva concord como colorantes para bebidas y postres de gelatina fueron estudiados, donde el estudio fue iniciado en un intento por definir las características de estabilidad de las antocianinas de uva concord en productos alimenticios (Clydesdale y otros, 1978). La extracción y uso de pigmentos del grano de maíz (*Zea mays* L.) como colorantes en yogur fue estudiada, donde se determinó el uso potencial de las antocianinas extraídas de granos de maíz, como colorantes en yogur (Salinas y otros, 2005).

Estos autores reportan que las antocianinas extraídas de la fracción pericarpio-capo de aleurona fueron añadidas a un yogur natural comercial, en concentración de 1 mg/100 g de yogur.

Las antocianinas de arándano y uva como colorantes en cereales para desayuno fue estudiada, donde se evaluó la estabilidad y aceptabilidad de antocianinas de arándano y de uva en cereales extruidos (Camire y otros, 2002). Estos autores reportan que los cereales para desayuno parecen ser un alimento deseable para la fortificación de antocianinas. A pesar de la pérdida durante la extrusión, cantidades suficientes de colorantes permanecen para producir un color púrpura. Las condiciones de extrusión deben ser optimizadas para minimizar la pérdida del pigmento, y adecuar el azúcar que debe ser adicionada para reducir la acidez. Otras fuentes de estos pigmentos pueden demostrar ser más estables durante el procesamiento.

**3. CAPITULO II: DESARROLLO EXPERIMENTAL**

A continuación se detalla la metodología planteada en esta investigación (Ver Figura 3.1.):

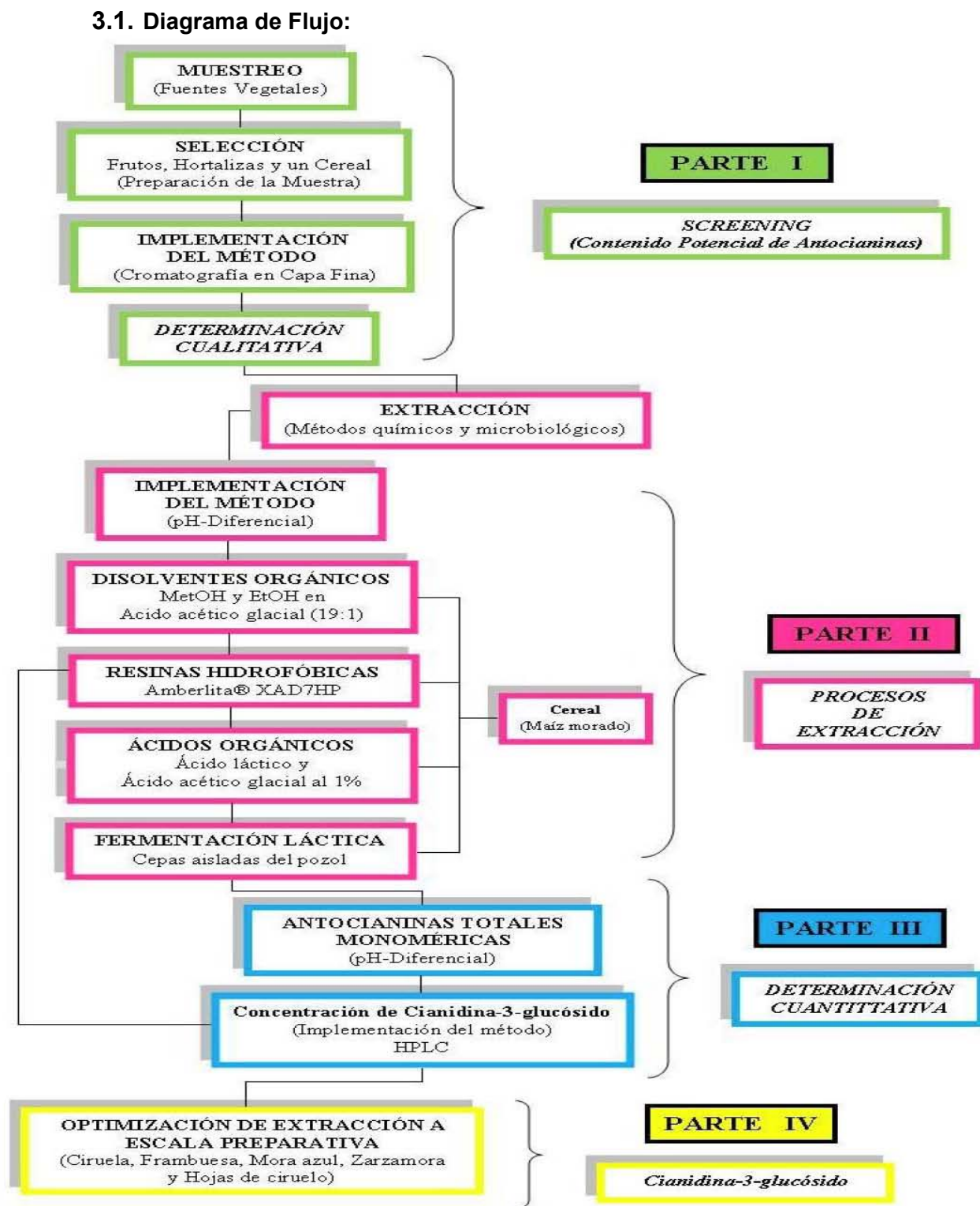


Figura 3.1. Diagrama de bloques de la metodología a seguir.

### 3.2. Reactivos:

#### ■ Parte Orgánica:

##### ● Disolventes orgánicos grado Q.P.<sup>7</sup>:

- Metanol: Q.P. (CH<sub>3</sub>OH), Ensayo 99.5%, Intervalo de destilación: entre 64.5 y 65°C, Humedad: 0.1%, PM: 32.04, Distribuidora Química Alvi CAS:67-56-1.
- Alcohol etílico: calidad 96% Ferandelh S.A. de C.V.
- Ácido acético: A.C.S. (CH<sub>3</sub>COOH), Calidad 99.9%, Fermont (Productos químicos monterrey, S.A. de C.V.).
- Acetato de etilo: Q.P. (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>), Ensayo 99%, Intervalo de destilación: 77°C, Residuos de evaporación: 0.02%, PM: 88.11, Distribuidora Química Alvi CAS: 141-78-6.
- Diclorometano: Q.P. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), Residuos de evaporación: 0.002%, PM: 84.93, REASOL CAS: 75-09-2.
- 

##### ● Reveladores:

- Reactivo de Anisaldehído: Solución de 100mL (85mL de MetOH + 10mL de ácido acético glacial + 5mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0.5mL de anisaldehído en baño de hielo).

#### ■ Parte Microbiológica:

- Caldo AP<sup>8</sup>, Caldo MRS y Agar MRS<sup>9</sup>

### 3.3. Equipos:

- Microbalanza AG245 Máx. 41g – 410g / d = 0.01mg Mettler Toledo.
- Agitador Orbital Lab-line Modelo 4629
- Rotavapor R-205 Büchi; Büchi Heating Bath B490.
- Balanza OHAUS CT-600-S capacidad 600x0.1g; opera a 0°C a 40°C y una humedad relativa de 10% - 65%
- Placas MACHEREY–NAGEL HPTLC–Fertiltatten Nano-Sil C<sub>18</sub>-100/UV<sub>254</sub> .
- Espectrofotómetro GBC-Cintral.
- Campana de flujo laminar
- Micropipetas GILSON de p100, p200 y p1000

---

<sup>7</sup> Q.P.: Químicamente puros.

<sup>8</sup> Caldo AP: Medio líquido de papa dextrosa.

<sup>9</sup> Medio de cultivo para lactobacilos y otras bacterias lácticas.

**PARTE I: Búsqueda de Materiales como Fuentes Potenciales de Antocianinas**

**3.4. Muestreo:**

La materia prima consistió en diferentes fuentes vegetales comprendidas entre frutos y hortalizas con un grado de madurez apto para el consumo humano; aquel estado de desarrollo en el que el fruto y/o vegetal alcanzó su máxima calidad estética y sensorial que lo hacen apto para su consumo inmediato (Hardenburg, 1986) y (Hulme, 1970). En el caso del cereal se recolectaron diferentes variedades de maíces criollos recolectados directamente con un productor de la localidad de Ixtenco, Estado de Tlaxcala, México, adquiridos de la cosecha 2011 que se cultivan por el método de siembra de temporal (Ver Figuras 3.2.).



Figuras 3.2. (a). Maíz morado (desgranado y su olote) (b). Siembra de temporal.

**3.5. Selección:**

Para el presente trabajo experimental se tomaron como criterios de selección: una búsqueda bibliográfica de las fuentes potenciales del contenido antocianídico, la homogeneidad e intensidad del color, el estado fisiológico de la muestra, la facilidad de su extracción y manipulación así como también la disponibilidad y el costo de cada una de las fuentes vegetales propuestas. En la Tabla 3.1.- se presenta un listado de las muestras vegetales seleccionadas para la realización del *Screening*<sup>10</sup>.

**Tabla 3.1.- Selección de muestras vegetales**

MUESTRAS			
Nombre común	Nombre científico	Nombre común	Nombre científico
<b>Frutos</b>		<b>Hortalizas</b>	
Ciruela	<i>Prunus domestica L.</i>	Cebolla	<i>Allium cepa</i>
Frambuesa	<i>Rubus idaeus</i>	Berenjena	<i>Solanun melongen</i>
Fresa	<i>Fragaria vesca L.</i>	Col morada	<i>Brassica Oleracea</i>
Mora azul	<i>Vaccinium corymbosum</i>	<b>Otras Fuentes Vegetales</b>	
Uva	<i>Vitis vinífera L.</i>	Hojas de Ciruelo	<i>Prunus cerasifera</i>
Zarzamora	<i>Rubus ulmifolius</i>	<b>Cereal</b>	
		Maíz morado	<i>Zea mays L.</i>

<sup>10</sup> Búsqueda de las Fuentes Potenciales de Antocianinas.

### 3.5.1. Preparación de las muestras:

Las muestras bajo estudio se trabajaron de la siguiente manera:

#### Muestras Frescas:

- a) Cáscara y pulpa de los siguientes frutos: *Fragaria vesca* L. ó fresa, *Prunus domestica* L. ó ciruela y *Vitis vinífera* L. ó uva roja.
- b) Cáscara de las siguientes hortalizas: *Solanun melongen* o berenjena y *Raphanus sativus* o rábano.
- c) Todo el fruto de *Vaccinium corymbosum* o mora azul. *Rubus idaeus* o frambuesa, *Rubus ulmifolius* o zarzamora y para el caso de las hortalizas, *Brassica oleracea capitata* o col morada y *Allium cepa* o cebolla morada.

#### Muestras Deshidratadas:

- a) Hojas de ciruelo (*Prunus cerasifera*.)
- b) En el cereal se procedió a desgranar el maíz (*Zea mays* L.) separando el olote del grano. Se trabajó con el pericarpio del maíz mediante un procedimiento de raspado con una lija de grano N° 100 y con la cascarilla del olote tras el desprendimiento de estas últimas con un rallador de cocina.

Las muestras se deshidrataron a una temperatura de 45°C con un flujo de aire de 3m/s.

Una vez deshidratadas las muestras se molieron hasta obtener un polvo fino y homogéneo que se procedió a tamizar en una malla de N°100.

#### 3.5.1.1. Determinación del contenido de Humedad:

Para conocer el contenido de humedad en las muestras deshidratadas se empleó el método oficial de la AOAC (N°925.10) de secado en horno ya que es un método directo y sencillo. El método se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa, de la muestra deseada hasta masa constante en estufa de aire utilizando una temperatura de 100°C (A.O.A.C., 1990).

#### 3.5.1.2. Preparación de las muestras para el Screening:

Se colocó 1g de las partes anteriormente mencionadas (fruto, cáscara, hoja, pericarpio y olote) de cada una de las fuentes vegetales seleccionadas. Se extrajeron con metanol/ácido acético (19:1 v/v) en matraces Erlenmeyer de 25 mL por 24 horas a

temperatura ambiente y agitación constante (280 r.p.m.). Se filtraron para ser concentradas en un rotavapor a 45°C y ser disueltas con lavados consecutivos de acetato hasta que las fases orgánicas no presentaran coloración.

Se desecharon recuperando las fases acuosas, las cuales se transfirieron a matraces bola de 50 mL evaporando el agua y llevando los extractos a sequedad. Los sólidos resultantes se recuperaron disolviendo en H<sub>2</sub>O destilada, los cuales se almacenaron en viales de 5 mL a una temperatura de 5 °C (**Extractos del Screening**).

### 3.6. Implementación del Método:

#### 3.6.1. Cromatografía en Capa Fina (CCF):

La cromatografía en capa fina (CCF) es un método rápido y sencillo de separación e identificación. Para el presente trabajo de investigación se propusieron dos sistemas de detección cualitativa, uno descrito por la literatura y el otro desarrollado en el laboratorio que a continuación se describen:

*Sistema BAW:* Se realizó utilizando como fases estacionarias; gel de sílice en aluminio y papel Whatman N°3, y como fase móvil para ambos soportes una mezcla de Butanol/Ácido acético/H<sub>2</sub>O 4:1:5 (v/v) sin revelador, únicamente identificando el compuesto de interés a través de la coloración de la placa una vez eluída (Froehlicher Thomas, 2009).

*Sistema desarrollado en el Laboratorio:* Se realizó utilizando como fase estacionaria; gel de sílice en vidrio y como fases móviles, tres sistemas de detección cualitativas y una referencia, con cuatro diferentes combinaciones de elución entre sí (Ver Tabla 3.2.-) revelando con reactivo de anisaldehído en caliente.

**Tabla 3.2.- Sistemas de elución para extractos del screening.**

Nombre	Sistema de disolventes			Relación (mL)
<b>Referencia</b>	Acetato de etilo/Metanol/H <sub>2</sub> O			(3:2:1)
<b>A</b>	Cloroformo/Metanol/H <sub>2</sub> O			
<b>B</b>	Acetato de etilo/Etanol/H <sub>2</sub> O			
<b>C</b>	Acetona/Etanol/H <sub>2</sub> O			
<b>Combinación de sistemas para CCF.</b>				
	N° de Cromatoplaca	Sistema A	Sistema B	Sistema C
<b>Fuentes Vegetales</b>	<b>1</b>		1° y 2° elución	
	<b>2</b>	1° elución	2° elución	
	<b>3</b>	2° elución	1° elución	
	<b>4</b>	2° elución		1° elución

### 3.7. Determinación Cualitativa:

Se efectuó un análisis cualitativo de la presencia de antocianinas en los *Extractos del Screening* de la Sección 3.5.1.2. por: CCF (Cromatografía en Capa Fina) con los sistemas de detección de la Sección 3.6.

## **PARTE II: Procesos de Extracción:**

### 3.8. Extracción de Antocianinas mediante Métodos Químicos:

En esta sección se describe la metodología utilizada para la extracción de antocianinas por triplicado que se realizó en pericarpio y olote del maíz morado empleando: disolventes orgánicos, resinas hidrofóbicas y ácidos orgánicos.

#### 3.8.1. Implementación del Método:

Las antocianinas totales se cuantificaron por el método diferencial de pH, según Wroslstad y col., (2005), basado en la reacción de estos compuestos ante cambios de pH en el medio. Para efectuar la reacción, se preparó un buffer con pH 1.0 de cloruro de potasio a una concentración de 0.025 M ajustando con HCl y el buffer a pH 4.5 de acetato de sodio 0.4M ajustando con ácido acético.

El total de antocianinas se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Antocianinas Totales (mg/L)} = \left[ \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\Sigma X 1} \right]$$

A partir de la cual los resultados se expresan en mg equivalentes de cianidina por 100 gramos de muestra, donde:

$$A = \left[ \left( A_{pH1(510_{nm})} - A_{pH1(700_{nm})} \right) - \left( A_{pH4.5(510_{nm})} - A_{pH4.5(700_{nm})} \right) \right]$$

MW = Peso molecular de cianidina-3-glucósido (449.2 g/mol).

DF = Factor de dilución.

$\Sigma$  = Coeficiente de extinción molar de cianidina-3-glucósido (26900 g/mol/cm) disuelto en MetOH.



### 3.8.2. Extracción con Disolventes Orgánicos:

Se tomaron 5 g de polvo que se extrajeron con 20 mL de metanol/ácido acético y 20 mL etanol/ácido acético (19:1 v/v) para cada muestra durante 24 horas a temperatura ambiente bajo agitación constante (280 r.p.m.) evitando su exposición a la luz. Posteriormente se filtra desechando la fase sólida y transfiriendo el filtrado a un matraz bola con boca esmerilada de 100 mL. Se concentraron en un rotavapor a 45°C y se redisolvieron con lavados de 75 mL de acetato de etilo y 5 mL de H<sub>2</sub>O destilada en un embudo de separación hasta que la fase orgánica no presentara coloración.

Se desechó la fase orgánica recuperando la fase acuosa, la cual se transfirió a un matraz bola de 50 mL evaporando el agua en un Rotavapor llevándolo a sequedad. El sólido resultante se recuperó disolviendo 5 mL de H<sub>2</sub>O destilada, los cuales se almacenaron en viales de 5 mL a una temperatura de 5 °C (***Extractos sin resina [SR]***).

### 3.8.3. Extracción con Resinas Hidrofóbicas:

A partir de los ***Extractos SR***, se tomaron 3 mL de cada uno y se llevaron a un aforo total de 5mL. Posteriormente se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 25 mL con 5g de resina (Amberlita® XAD7HP). Se extrajeron por 24 horas a temperatura ambiente bajo agitación constante (280 r.p.m.) evitando su exposición a la luz. Se filtraron al vacío mediante un matraz Kitasato de 150 mL y embudo Büchner, desechando las aguas madres y recuperando la resina colorida para su desorción. En cada resina se realizaron cuatro lavados consecutivos de 25 mL de una solución ácida (Metanol al 20% de ácido acético glacial) con un matraz Kitasato de 50 mL y embudo Büchner filtrando al vacío. La solución colorida se transfirió a un matraz bola de 250 mL para evaporar la mezcla de disolvente y agua que finalmente se llevó a sequedad en un rotavapor a 45°C. El sólido resultante se recuperó disolviendo 3 mL de H<sub>2</sub>O destilada desionizada, llevándolos a un aforo total de 5 mL los cuales se almacenaron en viales de 5 mL a una temperatura de 5 °C (***Extractos con resina [CR]***).

#### 3.8.4. Extracción con Ácidos Orgánicos:

Se tomó 1 g de muestra y se extrajo con 25 mL de una solución de ácido láctico al 1% y 25 mL de otra solución de ácido acético glacial al 1% en matraces Erlenmeyer de 250 mL a temperatura ambiente, por 24 horas bajo agitación constante (280 r.p.m.) sin exposición a la luz. Se filtra la muestra recuperando la fase líquida y descartando la fase sólida. El filtrado se transfirió a un matraz bola con boca esmerilada de 100 mL concentrando en un rotavapor a 45°C hasta llevar a sequedad. La muestra sólida del matraz fue recuperada en con 5 mL de H<sub>2</sub>O destilada desionizada y almacenada en viales de 5 mL a una temperatura de 5°C (**Extractos Ácidos Orgánicos [AO]**).

#### 3.9. Extracción asistida mediante una Fermentación Láctica:

En esta sección se describe la metodología empleada para la extracción de antocianinas asistida por una fermentación láctica (método microbiológico) por triplicado en el pericarpio del maíz morado.

##### 3.9.1. Microorganismos y su Conservación:

Los microorganismos de investigación son: *Lactobacillus fermentum* (77G), *Streptococcus infantarius* (25124), *Lactococcus lactis* (A45212) y *Streptococcus macedonicus* (A45201), cepas previamente aisladas del pozol (Ver Figura 3.3.) y caracterizadas como bacterias acidolácticas Gram (+) con propiedades amilolíticas. Las cepas se conservaron a -80°C en crioviales en caldo APT<sup>11</sup> y glicerol.



Figura 3.3. Bebida densa a base de maíz y cacao.

---

<sup>11</sup> Medio de cultivo líquido para enriquecimiento de bacterias fermentativas del ácido láctico.

### 3.9.2. Activación de las Cepas:

Los microorganismos se inocularon en caldo MRS<sup>12</sup> tomando 50 µL de cada una de las cepas contenidas en los crioviales a una temperatura de 30°C por 24 horas (1° siembra). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, mediante “picadura” se inocularon cada una de las cepas en viales con medio MRS semisólido (0.8% w/v de agar) más una punta de espátula de CaCO<sub>3</sub> por 24 horas a una temperatura de 30°C (2° siembra). Para confirmar de que se trata de Lactobacillus fermentum, Streptococcus infantarius, Lactococcus lactis y Streptococcus macedonicus, se realizó la verificación morfológica de los microorganismos como se describe más adelante. Posteriormente para la reactivación final de cada una de las cepas, se procedió a tomar por “picadura” (lo que tome el asa) siguiendo la fase sólida del crecimiento del microorganismo, una parte de células representativas de cada cultivo del medio semisólido para ser inoculados en caldo MRS incubados por 24 horas a 30°C (*Cultivos AC*).

Los viales con las cepas en medio MRS semisólido fueron guardados a temperatura de refrigeración (4-5 °C) por un tiempo límite de dos meses.

### 3.9.3. Verificación Morfológica de los Microorganismos:

Para confirmar las características macroscópicas de los microorganismos se usó medio de cultivo MRS. Se prepararon placas con agar MRS incubando cada una de las cepas a una temperatura de 30°C por 24 horas.

### 3.9.4. Fermentación Láctica:

Se procedió a realizar un experimento en función del descenso del pH con caldo MRS sin el pericarpio, únicamente monitoreando la densidad óptica y el pH, para esto se prepararon 100 mL de caldo MRS para cada cepa en matraces Erlenmeyer de 250 mL, los cuales se esterilizaron en una autoclave (121°C por 15 minutos). En la campana de flujo laminar en condiciones asépticas cada uno de ellos fue inoculado con un 1 mL de los cultivos iniciales (AC) ajustando previamente su densidad óptica<sup>13</sup>. Los matraces inoculados fueron introducidos en una incubadora a una temperatura de 30°C para iniciar la fermentación.

---

<sup>12</sup> Medio de cultivo para lactobacilos y otras bacterias lácticas.

<sup>13</sup> La absorbancia debe estar por debajo de 0.1.

El tiempo cero se registró a partir de cada inoculación, tomando la lectura de dos variables; el valor de pH con un potenciómetro y la densidad óptica en un espectrofotómetro a 600 nm<sup>14</sup>.

Para el monitoreo de la fermentación, las lecturas se registraron tomando 3 mL del medio de fermentación en condiciones asépticas colocándolos en tubos de 12x75 MM para el registro de la D.O. y otros 3 mL en vasos de precipitados de 50 mL para medir su pH. La lectura se realizó cada dos horas hasta que el pH de cada una de las muestras se mantuviera constante y el valor ya no descendiera (Ver Figura 3.4.).

Tiempo transcurrido para la fermentación	Cepa 77G		Cepa A45212		Cepa A45201		Cepa 25124	
	pH	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.
Tiempo 0								
2 hrs.								
4 hrs.								
6 hrs.								

Figura 3.4. Hoja de llenado para registrar la fermentación láctica.

Se trabajó con el microorganismo con mayor producción de ácido láctico, 1g de pericarpio irradiado del maíz morado y medio de cultivo (caldo MRS). Las fermentaciones se realizaron por triplicado incubándose a 30°C sin agitación por un periodo de 48 horas. Para el modelo experimental se probaron tres condiciones (modelos) de fermentación más dos tipos de controles que a continuación se describen:

- 1) 100 mL de medio MRS líquido estéril + 1g de pericarpio.
- 2) 100 mL de medio MRS líquido estéril + 1g de pericarpio + siembra de la cepa 77G.
- 3) 100 mL de medio MRS líquido estéril + siembra de la cepa 77G (una vez que el pH descendió a un valor cercano entre 3 y 3.4 se adicionó 1g de pericarpio).

**Control 1:** 100 mL de disolvente (MetOH) + 1g de pericarpio.

**Control 2:** Medio MRS líquido estéril.

<sup>14</sup> Se utilizó como blanco medio MRS estéril.

### **PARTE III: Determinación Cuantitativa**

#### **3.10. Cuantificación de Antocianinas Totales Monoméricas por pH-Diferencial:**

En esta sección se describe la metodología empleada para la determinación cuantitativa de la cantidad total de antocianinas monoméricas en los extractos del maíz morado de la Etapa II del presente trabajo experimental.

##### **3.10.1. Métodos Químicos:**

Se tomaron 400  $\mu\text{L}$  de cada uno de los *Extractos SR<sup>15</sup>, CR<sup>16</sup> y AO<sup>17</sup>* y el volumen se completó a 2 mL con los buffers respectivos. La absorbancia se registró en un espectrofotómetro UV-vis (GBC Cintral) a 510 nm. y 700 nm., utilizando como solución blanco agua destilada. Para calcular la concentración de antocianinas totales se empleó la fórmula metodología propuesta por Wroslstad y col., (2005) de la Sección 3.8.1. Los resultados se expresan como mg de antocianinas totales por gramo de muestra en peso seco.

##### **3.10.2. Extracción asistida por Fermentación Láctica:**

Transcurridas las primeras 24 horas de fermentación se procedió a extraer las antocianinas de los modelos experimentales de la sección 4.6.4. (Fermentación láctica) tomando 3 mL de cada medio de cultivo de los modelos experimentales. De estos últimos se tomó 1mL de medio de cada matraz y se depositó en tubos eppendorf estériles para ser sometidos a un proceso de centrifugación a 10000 r.p.m. a temperatura ambiente por 10 minutos.

Una vez depositado el material sólido en el fondo de cada uno de los tubos eppendorf, se tomó una alícuota de 400  $\mu\text{L}$  con una micropipeta de 1000  $\mu\text{L}$  para ser cuantificados mediante pH diferencial según Wroslstad y col., (2005), basado en la reacción de estos compuestos ante cambios de pH en el medio. Este mismo procedimiento se realizó a las 48 horas de fermentación así como también para los modelos experimentales 4 y 5 (controles).

---

<sup>15</sup> Extractos sin Resina de la Sección 3.8.2.

<sup>16</sup> Extractos con Resina de la Sección 3.8.3.

<sup>17</sup> Extractos con Ácidos Orgánicos de la Sección 3.8.4.

Para los 2 mL restantes de cada toma de muestra (24 y 48 hrs. de fermentación) se tomó lectura de la densidad óptica y el valor del pH. Los resultados se expresan como mg de antocianinas totales por gramo de muestra en peso seco.

### 3.11. Cuantificación de Antocianinas por HPLC:

En esta sección se presenta la metodología empleada para la determinación cuantitativa de la concentración de cianidina-3-glucósido en los **Extractos CR** del maíz morado.

#### 3.11.1. Implementación del Método:

Se adecuó el método propuesto por (Fossen Torgils, 2001) para cuantificar los extractos por HPLC modificando una de las fases móviles empleando ácido acético en lugar de ácido fórmico. Se efectuaron diferentes ensayos con tiempos y velocidades de flujo por las características de la columna empleada. El método consistió de la siguiente manera:

- i. **Equipo:** HPLC 1525 Waters con bomba binaria desgasificador externo con lector UV Waters 2847 Dual.
- ii. **Software:** Breeze 3.0.
- iii. **Columna:** ODS Hypersil 250 x 4.6, 5  $\mu$ m, Temperatura ambiente.
- iv. **Longitud de onda:** 520 nm.
- v. **Fases móviles de disolventes:**
  - Fase A: Ácido acético: Agua (10:90 v/v)
  - Fase B: Metanol: Agua: Ácido acético (50:40:10 v/v).
- vi. **Flujo:** 1.2 mL/min con un gradiente del 60% hasta 100% de B durante 15 minutos, seguido de un flujo isocrático del 100% de B durante 3 minutos para finalmente pasar por un gradiente lineal de 100% de B hasta un 100% de A durante 27 minutos.
- vii. **Tiempo de corrida:** 25 minutos.

#### 3.11.2. Preparación de muestras:

Se tomó 1 mL de cada uno de los **Extractos CR** y se hicieron pasar por una membrana de 0.45  $\mu$ m., para ser depositados en viales de 1.5 mL. Se adicionaron con 1 a 2 gotas de ácido acético glacial y se procedieron a inyectar en el equipo por triplicado.

**3.11.3. Elaboración de Curva Patrón y Cuantificación por HPLC:**

Se empleó el **Extracto CR** de Hojas de Ciruelo enriquecido en cianidina como estándar para la cuantificación de cianidina-3-glucósido por HPLC con un 93% ( $\pm 3.12$ ) de pureza. Se obtuvo la concentración del compuesto en las muestras problema interpolando en la curva patrón correspondiente. Ver ANEXO I.

**PARTE IV: Cianidina-3-glucósido**

**3.12. Optimización de Extracción a Escala Preparativa:**

Se unificó y escaló el método seleccionado; extracción con disolventes orgánicos y su purificación con resinas hidrofóbicas, a 25 gramos de muestra. En la Tabla 4.3.- se presentan la selección de las fuentes vegetales empleadas y la parte del fruto u hortaliza con la que se trabajó.

**Tabla 4.3.- Preparación de la muestra.**

Muestra		Materia prima experimental
<b>Frutos</b>		
<i>Ciruela</i>	Muestra fresca	Cáscara y Pulpa del fruto
<i>Frambuesa</i>		
<i>Mora azul</i>		
<i>Zarzamora</i>		
<b>Otras Fuentes Vegetales</b>		
<i>Hojas de Ciruelo</i>	Muestra seca	Hojas

De acuerdo a la Tabla 4.3.-, cada una de las muestras se extrajeron con 60 mL de metanol/ácido acético y 20 mL etanol/ácido acético (19:1 v/v) durante 24 horas a temperatura ambiente bajo agitación constante (280 r.p.m.), evitando su exposición a la luz. Posteriormente se filtró desechando la fase sólida y transfiriendo el filtrado a un matraz bola con boca esmerilada de 250 mL. Se concentraron en un rotavapor a 45°C y se redisolviaron con lavados de 75 mL de acetato de etilo y 5 mL de H<sub>2</sub>O destilada en un embudo de separación hasta que la fase orgánica no presentara coloración.

Se desechó la fase orgánica recuperando la fase acuosa, la cual se transfirió a un matraz bola de 100 mL evaporando el agua y llevando a sequedad. El sólido resultante se recuperó disolviendo 5 mL de H<sub>2</sub>O destilada, los cuales se almacenaron en viales de 5 mL a una temperatura de 5 °C (**Extractos sin resina [SR2]**).

A partir de los **Extractos SR2**, se tomaron 3 mL de cada uno y se llevaron a un aforo total de 5mL. Posteriormente se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 25 mL con 5g de resina (Amberlita® XAD7HP). Se extrajeron por 24 horas a temperatura ambiente bajo agitación constante (280 r.p.m.) evitando de nueva cuenta la exposición a la luz. Se filtraron al vacío mediante un matraz Kitasato de 150 mL y embudo Büchner, desechando las aguas madres y recuperando la resina colorida para su desorción.

En cada resina se realizaron cuatro lavados consecutivos de 25 mL de una solución ácida (Metanol al 20% de ácido acético glacial) con un matraz Kitasato de 50 mL y embudo Büchner filtrando al vacío. La solución colorida se transfirió a un matraz bola de 250 mL para evaporar la mezcla de disolvente y agua que finalmente se llevó a sequedad en un rotavapor a 45°C. El sólido resultante se recuperó disolviendo 3 mL de H<sub>2</sub>O destilada desionizada, llevándolos a un aforo total de 5 mL los cuales se almacenaron en viales de 5 mL a una temperatura de 5 °C (**Extractos con resina [CR2]**).

Se cuantificó la cantidad de antocianina total presente en cada extracto tomando 400 µL de cada uno de los **Extractos [SR2]** y **[CR2]** completando a 2 mL el volumen total con los buffers respectivos. La absorbancia se registró en un espectrofotómetro UV-vis (GBC Cintral) a 510 nm. y 700 nm., utilizando como solución blanco agua destilada. Para calcular la concentración de antocianinas totales se empleó la formula metodología propuesta por Wroslstad y col., (2005) de la Sección 3.8.1. Los resultados se expresan como mg de antocianinas totales por gramo de muestra en peso seco.

La identificación cuantitativa de cianidina-3-glucósido se realizó mediante HPLC (Ver Sección 4.7.1) en los **Extractos CR2** tomando 1 mL de cada uno de ellos haciéndolos pasar por una membrana de 0.45 µm., para ser depositados en viales de 1.5 mL. Se adicionaron 1 a 2 gotas de ácido acético glacial y se procedieron a inyectar por triplicado en el equipo. Para calcular la concentración de cianidina-3-glucósido en las muestras problema, se interpolaron los resultados en una curva de calibración (Ver ANEXO I) usando como estándar el extracto de hojas de ciruelo expresando los resultados en mg de cianidina-3-glucósido por gramo de muestra en peso fresco. (Ver Figura 3.5.)





Figura 3.5. Optimización de la Extracción a Escala Preparativa.

4. CAPITULO IV:

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

**PARTE I: Búsqueda de Materiales como Fuentes Potenciales de Antocianinas**

**4.1. Muestreo y Selección:**

Se recolectaron diferentes variedades de frutillas, hortalizas y fuentes vegetales no comestibles además de distintas variedades de maíz criollo de la localidad de Ixtenco, Estado de Tlaxcala, México. Las frutillas y hortalizas fueron recolectadas directamente del mercado en condiciones óptimas para su consumo humano; es decir, las muestras se encontraban en un estado fisiológico maduro, las fuentes vegetales no comestibles fueron proporcionadas en el laboratorio donde se desarrolló el presente trabajo experimental y por último, los maíces criollos fueron recolectados de la cosecha 2011 tras ser cultivados mediante el método de siembra temporal. Es importante señalar que la entidad elegida del municipio del Estado de Tlaxcala representa una de las localidades con mayor variedad de granos coloridos. En total se colectaron seis variedades de frutillas; ciruela, frambuesa, fresa, mora azul, uva y zarzamora, tres diferentes hortalizas; cebolla morada, berenjena y col morada, hojas de ciruelo como fuente vegetal no comestible y por último una variedad de maíz criollo; maíz morado. En cada una de las fuentes vegetales se realizó una inspección buscando aquellas sin daño e impurezas utilizando dos criterios de selección; intensidad del color y coloración en la superficie de cada muestra.

**4.2. Determinación del Contenido de Humedad:**

El contenido de humedad se determinó por secado en estufa hasta peso constante de la muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.1.-

El contenido de humedad para los frutos oscila entre un 80.70% como valor mínimo y un 92.5% como valor máximo de humedad; es decir, se trabajó con frutos con contenidos altos de agua. Para el caso de las hortalizas no se observa una variación significativa en el contenido de humedad pero todas las hortalizas seleccionadas tienen más de un 80% de agua lo cual indica que son fuentes en donde la mayor parte de la carnosidad está compuesta por agua.

Por último, en las hojas de ciruelo y el maíz morado (pericarpio y olote) la humedad a comparación de las demás fuentes es mínima ya que la muestra bajo estudio forma parte secundaria del vegetal como son: las hojas, pericarpio y olote. Se reporta un 4.30% para las hojas de ciruelo y un promedio de 8.5% para el maíz morado. Con estos datos es posible reportar la concentración de los compuestos bioactivos en base húmeda y base seca.

**Tabla 4.1.- Contenido de Humedad**

Muestra	% de Humedad
<b>FRUTOS</b>	
Ciruela	86.00 ± 0.7109
Frambuesa	92.50 ± 0.0183
Fresa	91.10 ± 0.5639
Mora azul	93.00 ± 0.0235
Uva	80.70 ± 0.0986
Zarzamora	85.60 ± 0.0568
<b>HORTALIZAS</b>	
Cebolla morada	90.40 ± 0.0754
Berenjena	90.80 ± 0.0345
Col Morada	90.10 ± 0.0984
<b>OTRAS FUENTES VEGETALES</b>	
Hojas de Ciruelo	4.30 ± 0.0984
<b>CEREAL</b>	
Maíz morado (Pericarpio)	8.60 ± 0.0294
Maíz morado (Olote)	8.34 ± 0.0451

### 4.3. Identificación Cualitativa:

Con la finalidad de observar si las antocianinas se encontraban presentes en cada una de las muestras de los frutos, hortalizas, cereales y otras fuentes vegetales, se montaron dos sistemas de Cromatografía en Capa Fina (CCF) identificando el compuesto a través de la coloración impartida en la cromatoplaque y empleando reactivo de anisaldehído como revelador para identificar los compuestos fenólicos tras ser eluidos en el sistema de detección. Todas las muestras fueron sometidas a una extracción con metanol y ácido acético (19:1) por 24 horas, agitación constante (180 r.p.m.) y a temperatura ambiente, obteniendo extractos que posteriormente se aplicaron en placas de sílica gel para ser eluidas en uno y tres tiempos para la separación de las antocianinas, utilizando como eluyentes sistemas implementados dentro del laboratorio [metanol/acetato de etilo/H<sub>2</sub>O, cloroformo/metanol/H<sub>2</sub>O, acetato de etilo/etanol/H<sub>2</sub>O y acetona/etanol/H<sub>2</sub>O (3:2:1 v/v)] y un sistema reportado por la literatura [butanol/ácido acético/H<sub>2</sub>O (4:1:5 v/v) (Froehlicher Thomas, 2009)]. Los estándares utilizados fueron: un colorante de Tabasco<sup>18</sup> disuelto en metanol ácido y el extracto de ciruela, en este último se encuentra mayoritariamente presente el compuesto de interés que es la cianidina-3-glucósido (Socaciu, 2008). En la Figura 4.1., se muestran los resultados obtenidos para los extractos de metanol/ácido acético que se revelaron con reactivo de anisaldehído en caliente. Se puede observar que para los extractos de las muestras de ciruela, mora azul, berenjena, cebolla, pericarpio del maíz morado y col morada (carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 8) con Rf's aproximadamente de 0.7, se presentan manchas intensas del mismo color (azul-negro), esta última representado el compuesto de interés (cianidina-3-glucósido). En los extractos de las muestras de ciruela, mora azul, pericarpio del maíz morado y col morada (carriles 2, 3, 6 y 8) se observa que hay manchas de coloración rojiza superiores (Rf 0.8) al compuesto de interés mientras que para los extractos de fresa, berenjena y cebolla (carriles 1, 4 y 5) también se presentan estas mismas pero de coloración café. Por debajo del compuesto de interés se encuentran dos tipos de coloración; manchas rosas en tonos intensos que corresponden a los extractos de de fresa y col morada (carriles 1 y 8) y otras en tonos tenues en los extractos de ciruela, mora azul, berenjena,

---

<sup>18</sup> Colorante proporcionado en el Laboratorio 321 del edificio E en la Facultad de Química proveniente del edo. Tabasco, México.

cebolla y pericarpio del maíz morado (carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7). Cabe mencionar que el extracto del colorante de Tabasco (carril R<sub>1</sub>) presentó una mancha de color morado con un R<sub>f</sub> aproximado de 0.8 pero que no coincidió con ninguna otra mancha de los demás extractos.

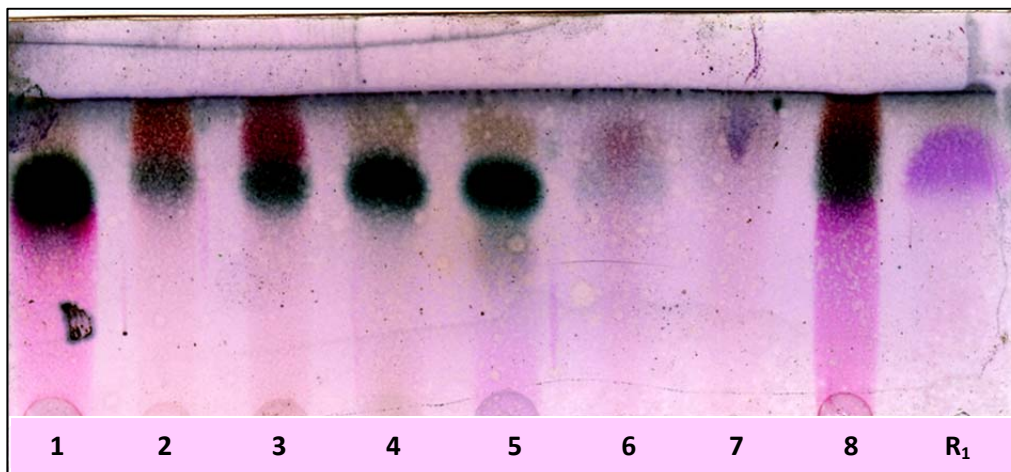


Figura 4.1. Cromatoplaça N°1: Cromatografía en capa fina de gel de sílice. 1. Fresa (*Fragaria vesca* L.), 2. Ciruela (*Prunus domestica* L.), 3. Mora azul (*Vaccinium corymbosum*), 4. Berenjena (*Solanun melongen*), 5. Cebolla morada (*Allium cepa*), 6. Maíz morado <sup>s/Resina</sup> (*Zea mays*), 7. Maíz morado <sup>c/Resina</sup> (*Zea mays*), 8. Col morada (*Brassica Oleracea var capitata*), 9. R<sub>1</sub> Colorante de Tabasco. Eluida con metanol/acetato de etilo/H<sub>2</sub>O en proporción (3:2:1 v/v) revelada con anisaldehído.

En las Figuras 4.2. a 4.4. se presentan los resultados obtenidos para los extractos de ciruela, fresa, mora azul, cebolla morada y berenjena en metanol ácido. Todos los extractos se eluyeron en tres tiempos con los siguientes sistemas: metanol/acetato de etilo/H<sub>2</sub>O, cloroformo/metanol/H<sub>2</sub>O, acetato de etilo/etanol/H<sub>2</sub>O y acetona/etanol/H<sub>2</sub>O (3:2:1 v/v), reveladas con reactivo de anisaldehído en caliente de acuerdo a la Tabla 3.2.- de la Sección 3.6.1. En la Figura 4.2. (a) y (b) se puede observar que para los extractos de ciruela y fresa, la resolución de cada una de las cromatoplaças una vez cambiada la polaridad de los sistemas de detección se obtiene la misma mancha negra (recuadro en rojo) como en la Figura 4.1. (carril 2) acompañada también de otra serie de compuestos en tonalidades rojizas. Para el caso del extracto de fresa también se presenta la misma mancha negra (recuadro en rojo) como en la Figura 4.1. (carril 1) y con un R<sub>f</sub> menor a este último, otro compuesto en tonalidad rosa que por el tipo de sistema empleado en función del pH, esta se torna violeta. En la Figura 4.3. (a) y (b) se observa que para los extractos de mora azul y cebolla morada, la resolución de cada una de las cromatoplaças una vez cambiada la polaridad de los sistemas de detección también se obtienen resultados similares como en la Figura 4.1.

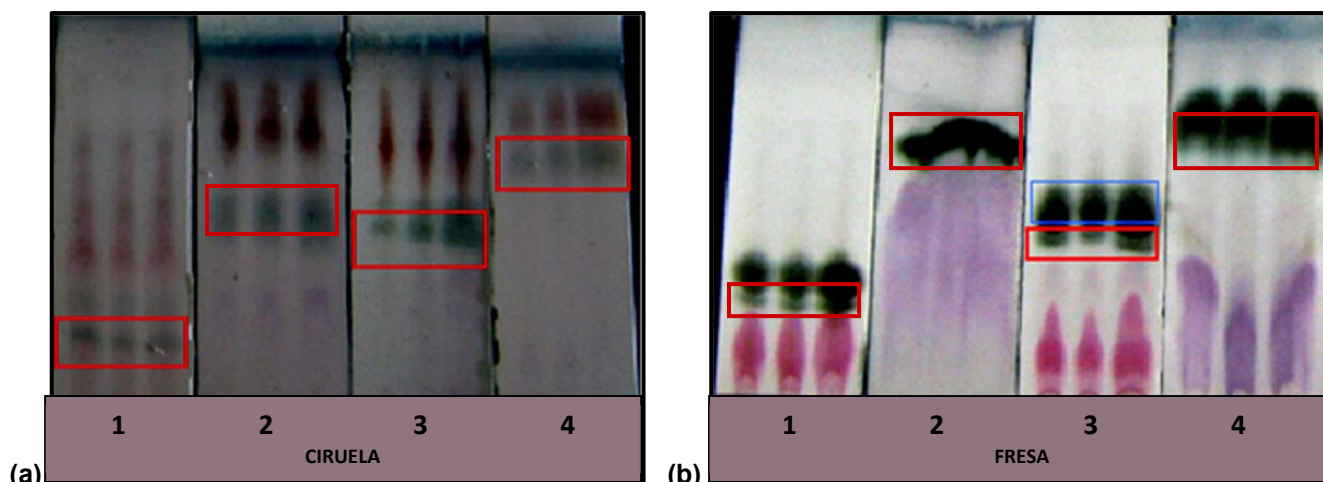


Figura 4.2. Cromatoplaça N°2: De acuerdo a la Tabla 3.2.- de la Sección 3.6.1. , se muestran las cromatoplaças correspondientes a las muestras: (a). Ciruela (*Prunus domestica L.*) y (b). Fresa (*Fragaria vesca L.*), según los cuatro sistemas de elución para CCF propuestos para la detección cualitativa de antocianinas; Cianidina (rojo) y Peonidina (azul).

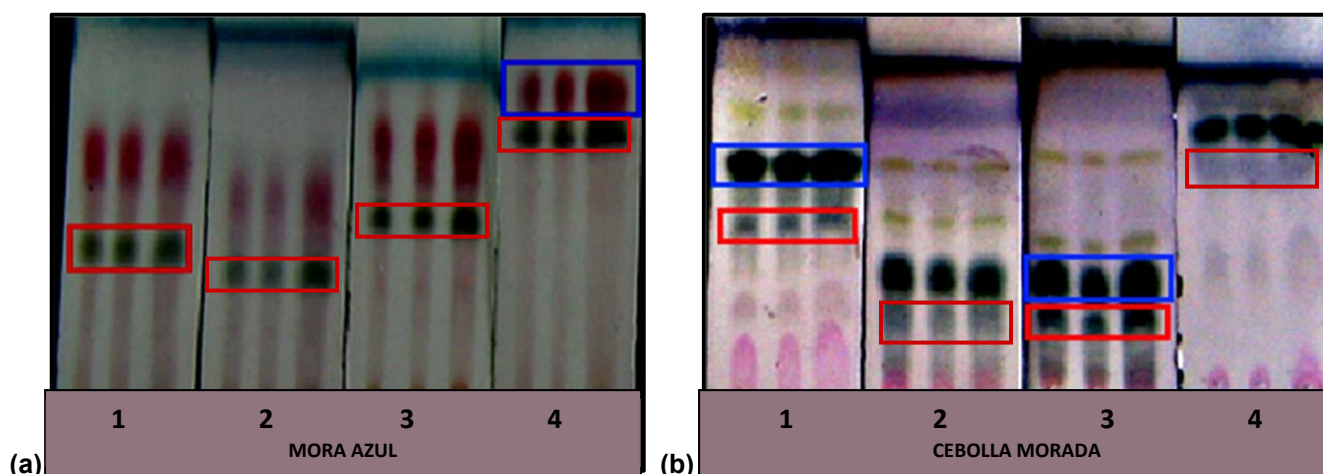


Figura 4.3. Cromatoplaça N°3: De acuerdo a la Tabla 3.2.- de la Sección 3.6.1. , se muestran las cromatoplaças correspondientes a las muestras: (a). Mora azul (*Vaccinium corymbosum*), y (b). Cebolla morada (*Allium cepa*), según los cuatro sistemas de elución para CCF propuestos para la detección cualitativa de antocianinas; Cianidina (rojo) y Peonidina (azul).

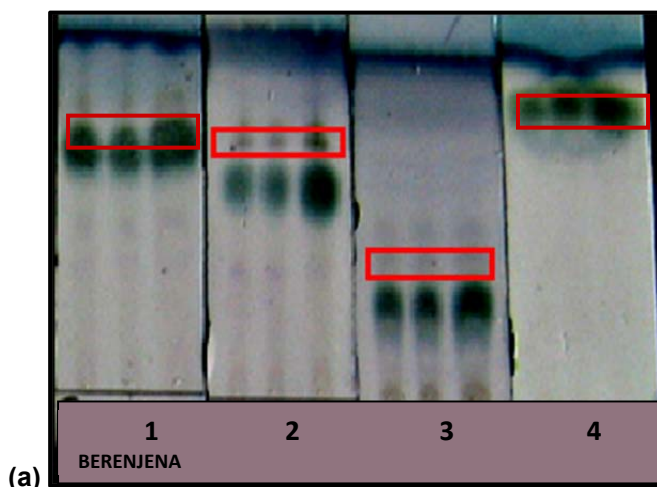


Figura 4.4. Cromatoplaça N°4: De acuerdo a la Tabla 3.2.- de la Sección 3.6.1. , se muestran las cromatoplaças correspondientes a las muestras: (a). Berenjena (*Solanum melongena*), según los cuatro sistemas de elución para CCF propuestos para la detección cualitativa de antocianinas; Cianidina (rojo).

En ambos extractos se obtiene la misma mancha negra (recuadro en rojo) como posible cianidina; sin embargo estos extractos están acompañados de otra serie de compuestos; en tonalidades rojizas para el extracto de moras y en tonalidades que van desde el verde, rosa, azul, etc... para el extracto de cebolla morada.

Se ha reportado en la literatura que la antocianina mayoritaria presente en la berenjena es la delfinidina; por tanto, como se muestra en el cromatograma de la Figura 4.4., la mancha abundante que se observa, probablemente pertenezca a dicha antocianina y no precisamente a la cianidina. De esta forma, el extracto de cebolla al contener una serie tan compleja de compuestos y el extracto de berenjena al no contener cianidina, quedan descartados para el análisis cuantitativo. En la Figura 4.5., se muestran los resultados obtenidos tras realizar una cromatografía en capa fina para los extractos de olote del maíz morado, hojas de ciruelo y ciruela en metanol/ácido, que por los resultados cualitativos obtenidos y datos reportados en la literatura reflejaron ser fuente potencial en su contenido antocianídico, principalmente en cianidina-3-glucósido. Los extractos se eluyeron el siguiente sistema: butanol/ácido acético/H<sub>2</sub>O (4:1:5 v/v) sin revelar.

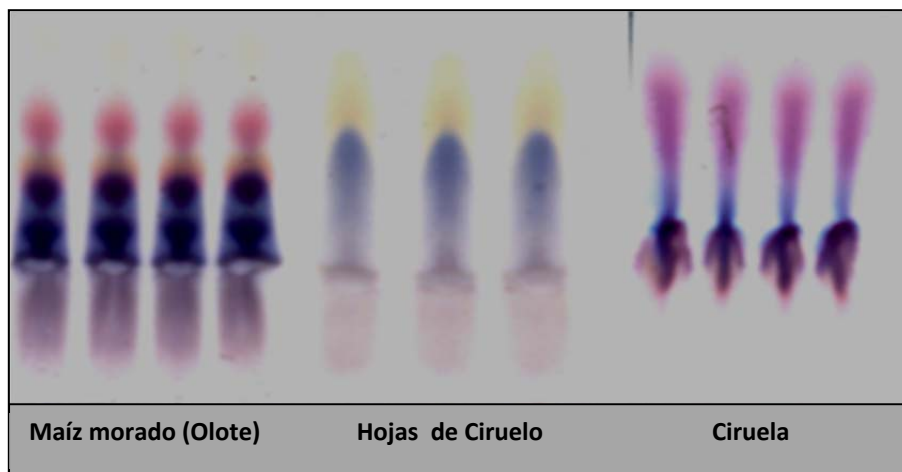


Figura 4.5. Cromatoplaqueta N°5: De acuerdo a la sección 4.6 y 4.7.1., se muestra la cromatoplaqueta correspondiente a las muestras: Maíz morado (*Zea mays*), Ciruela y sus hojas (*Prunus domestica L.*), según el sistema de elución (BAW) para la detección cualitativa por color de antocianinas.

En el cromatograma de la Figura 4.5. se observan coloraciones que van desde tonos naranjas claros hasta tonalidades intensas en azul, morado y rosa.

En las tres muestras se presenta en común la tonalidad en rojo púrpura siendo este tipo de coloración la que se presenta para la antocianina cianidina como se reporta en la literatura. En resumen, los dos sistemas de detección cualitativo mediante cromatografía en capa fina permiten analizar la presencia de antocianinas, sin embargo, sin estándares comerciales de cianidina-3-glucósido se complica más el análisis ya que en algunos cromatogramas hay muestras que presentan más de un compuesto que imparte coloración aun cuando esta se revela. Otro dato importante que se observa mediante esta implementación del método es la mezcla compleja que se obtiene tras extraer antocianinas con disolventes orgánicos de fuentes vegetales y realizarles una capa fina. Esta mezcla puede estar constituida principalmente por otro tipo de colorantes, ácidos hidroxicinámicos y mayoritariamente por azúcares. Finalmente, estas dos técnicas de análisis cualitativo permitieron seleccionar al maíz como la fuente vegetal óptima para la segunda parte experimental, específicamente con el pericarpio y el olote del maíz criollo colorido.

### **PARTE II : Procesos de Extracción**

En esta sección se analizan las causas de la selección de cada una de las condiciones de extracción para las antocianinas. Debido a las condiciones de extracción, el tipo de disolvente, la temperatura y el tiempo de exposición que reportan (Giusti y Wrolstad, 1996), se procedió a extraer las antocianinas del pericarpio y el maíz morado mediante dos métodos; el primero de manera química, empleando disolventes orgánicos, resinas hidrofóbicas y ácidos orgánicos, y el segundo de forma microbiológica, asistiendo la extracción con una fermentación láctica.

Todas estas extracciones tuvieron la finalidad de ser moduladas en orden para producir pigmentos de alta calidad y reducir la pérdida durante su producción ya que la duración de cada una de ellas así como los procedimientos de reextracción afectan la recuperación y pureza de las antocianinas, es por eso que los procesos de extracción para obtener soluciones enriquecidas de antocianinas a partir del pericarpio y el olote del maíz morado, se realizaron mediante métodos convencionales y no convencionales generados a partir de una revisión bibliográfica.



## **4.4. Extracción con Disolventes Orgánicos, Resinas Hidrofóbicas y Ácidos Orgánicos:**

Las antocianinas son solubles en disolventes polares y son extraídos normalmente de los materiales vegetales usando metanol acidificado con ácido clorhídrico o ácido fórmico. El ácido al bajar el pH de la solución previene la degradación de los pigmentos antocianídicos no acilados (Choung, 2004); (Wong, 1995) y (Awika, 2004), por tanto la extracción de las antocianinas a partir del pericarpio y el olote obtenidas de la muestra de maíz morado se efectuó usando dos disolventes distintos. Uno fue metanol/ácido acético, en proporciones de 19:1 v/v y el otro fue etanol/ácido acético, usando exactamente las mismas proporciones. El metanol es más efectivo que el etanol para la extracción de antocianinas (Yong y otros, 2003). Sin embargo, la extracción se realizó con los dos disolventes para comparar los perfiles de antocianinas obtenidos cuando se emplea uno u otro. Una técnica común usada para purificar los extractos de antocianina es a partir de reextracciones con cartuchos o resinas, por ejemplo, los grupos hidróxilos libres de las antocianinas en este tipo de extractos son retenidos fuertemente por la matriz del cartucho o la resina empleada los cuales requieren de un gradiente polar posterior como lo es el uso de disolventes orgánicos para eluir los compuestos fenólicos. De esta manera, Talcott (2002), propone que este tipo de técnicas son apropiadas para eliminar compuestos hidrófilos que puedan interferir con análisis posteriores como azúcares y ciertos ácidos orgánicos. Por otro lado, este tipo de procedimientos también es reconocido como un primer paso en el proceso de concentración. (Cuevas Montilla, y otros, 2012) reportan que para los pigmentos del grano de maíz una vez obtenidos los extractos enriquecidos de antocianinas, se aplican a columnas de Amberlita XAD-7, utilizando agua como disolvente de lavado, y como eluyente metanol/ácido acético en proporción de: 19:1 v/v, que finalmente se concentran en un rotavapor y se vuelven a liofilizar. Otros estudios reportan que de la muestra concentrada y enriquecida en antocianinas, se realiza una doble purificación en la cual se hace pasar el extracto por una columna de Amberlita XAD-7, usando agua acidificada al 5 % con ácido acético (A) y metanol acidificado al 5 % con ácido acético (B), para lavar la columna y liberar los pigmentos retenidos en la columna para finalmente purificar el extracto mediante una columna Sephadex (Salas, 2003).

De esta forma, se procedió a tratar con resina Amberlita los extractos enriquecidos en antocianinas provenientes de la extracción con disolventes orgánicos **Extractos SR** para tener extractos semipuros en cianidina (**Extractos CR**).

Otro tipo de procedimiento para la extracción de antocianinas en fuentes vegetales está basado en la utilización de ácidos orgánicos, por ejemplo; (Revilla 1998), encontró en uvas rojas que usando 0.12 mol/L del ácido clorhídrico se podía causar la hidrólisis parcial de las antocianinas no aciladas y aciladas. Sin embargo, varios estudios contradijeron a este autor (Dao 1998) y (Merken 2001), ya que para generar hidrólisis requirieron concentraciones mayores a 1.2 mol/L. El autor (Merken, 2001) utiliza un extracto puro de antocianinas, ensayando diferentes concentraciones de HCl (0.6-2.4 M) en 50% metanol para generar hidrólisis, con dicho experimento concluyó que para generar una hidrólisis efectiva se requiere utilizar concentraciones encima de 1.8 M. Actualmente las antocianinas se obtienen industrialmente mediante extracción con agua sulfitada, agua acidificada, dióxido de carbono, metanol o etanol a partir de las cepas naturales de hortalizas y frutas comestibles.

Las antocianinas contienen componentes comunes del material de origen, como antocianina, ácidos orgánicos, taninos, azúcares, minerales, etc., pero no necesariamente en las mismas proporciones que se encuentran en el material de origen. Luego entonces, el objetivo de usar dichos ácidos (ácido láctico y acético), aparte de proveerle estabilidad a la molécula es en sí provocar la lisis de la matriz donde están las antocianinas y conseguir una mayor liberación de los compuestos de interés.

#### **4.5. Extracción auxiliada por una Fermentación Láctica:**

Se decidió extraer las antocianinas del pericarpio del maíz morado (*Zea mays*) asistiéndola mediante una fermentación láctica inicialmente con cuatro bacterias ácido lácticas con propiedades amilolíticas y aisladas del pozol, en un medio donde hay almidón disponible en el pericarpio, para que éstas lo ocuparan como fuente de carbono y a su vez liberaran la antocianina del polvo una vez que el medio se acidificara por medio de la producción de ácido láctico. De esta forma obtener un extracto enriquecido en antocianinas y así poder cuantificar y aislar el compuesto de interés que es la cianidina-3-glucósido.

- **Verificación Morfológica de los Microorganismos:**

Los resultados obtenidos tras la verificación morfológica de los microorganismos de investigación se presentan en la Figuras 4.6.

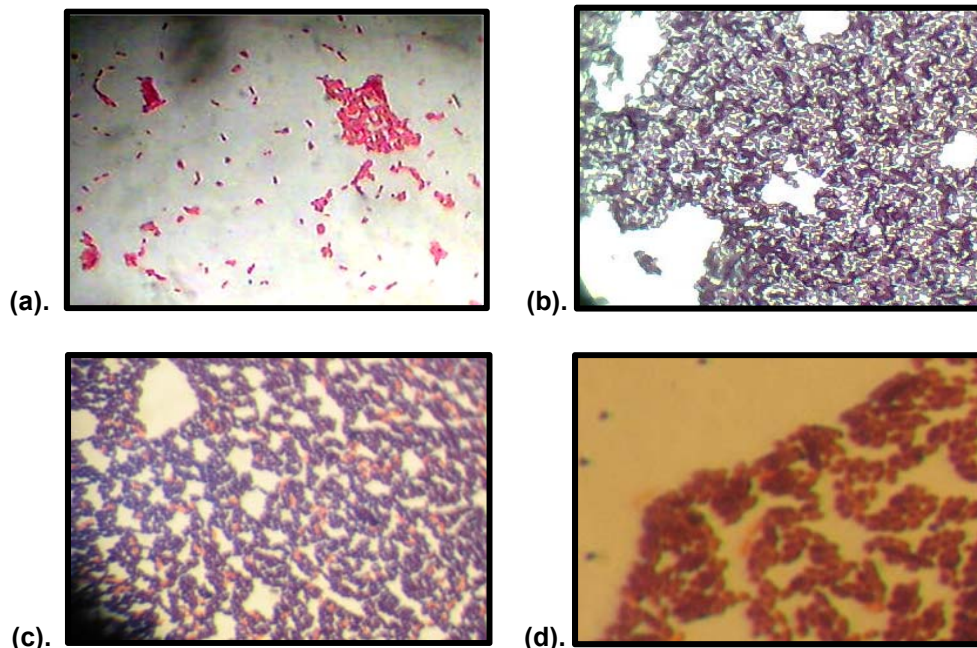


Figura 4.6. (a). Muestra: 77G *Lactobacillus fermentum*, Descripción: Gram negativo, bacilos solos y gordos. (b). Muestra: A45212 *Lactococcus lactis*, Descripción: Gram positivo, cocos algunos en racimos de 4 ó más. (c). Muestra: A45201 *Streptococcus macedonicus*, Descripción: Gram positivo, diplococos que tienden a elongarse. (d). Muestra: 25124 *Streptococcus infantarius*, Descripción: Gram positivo, cocos algunos en racimos de 4 ó más. Fecha: 20/09/10 Tinción: Diferencial de Gram, Aumento: 1250 x.

En la Figura 4.6. se puede observar que las características microscópicas que poseen cada una de las cepas de investigación para realizar la fermentación láctica si cumplen con lo reportado en la literatura para cepas acidolácticas con propiedades amilolíticas aisladas de pozol.

#### 4.5.1. Fermentación Láctica:

En la Tabla 4.2.- se presentan los resultados obtenidos tras el seguimiento de la fermentación láctica. La finalidad de realizarlos fue encontrar de cuatro cepas acidolácticas y con propiedad amilolítica elevada, aquella que acidificara más el medio, preferentemente que descendiera el pH hasta 3, así como también la adaptabilidad de cada una de ellas en el medio de fermentación ya que estos factores serán primordiales para la extracción de antocianinas en el pericarpio del maíz morado.

Tabla 4.2.- Monitoreo de la Fermentación Láctica.

Tiempo transcurrido de la fermentación	Microorganismos							
	Cepa 77G		Cepa A45212		Cepa A45201		Cepa 25124	
	pH	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.	pH	D.O.
Tiempo 0	6.53	0.0089	6.66	0.3827	6.51	0.3952	6.53	0.4249
2 hrs.	6.4	0.0677	6.02	0.3657	5.98	0.4287	6.16	0.2897
4 hrs	5.81	0.5626	4.78	1.4429	4.5	1.513	4.81	1.4709
6 hrs.	5.34	0.8225	4.62	1.5111	4.38	1.5524	4.49	1.5869
8 hrs.	4.87	1.1611	4.43	1.539	4.28	1.5733	4.32	1.6069
24 hrs.	3.68	2.2092	3.96	1.6304	3.94	1.6009	3.85	1.6271
26 hrs.	3.68	2.2209	3.93	1.6636	3.94	1.6406	3.83	1.6654
28 hrs.	3.69	2.2187	3.91	1.6744	3.94	1.6567	3.83	1.6754

En los gráficos de la Figura 4.7. se puede observar que en las primeras horas de la fermentación se tuvo un descenso drástico en el pH, lo cual indicó que las cepas son buenas productoras de ácido láctico y que no requirieron de algún otro nutriente para descender el valor del pH, sin embargo, transcurridas las 20 horas de fermentación se observa que las cepas entran en una fase estacionaria en la que el valor del pH se mantiene constante y no se alcanzan valores por debajo de 3.69. El valor de pH más bajo lo presentó la cepa 77G con un pH de 3.69 y el valor más alto la cepa A45201 con un valor de pH 3.94.

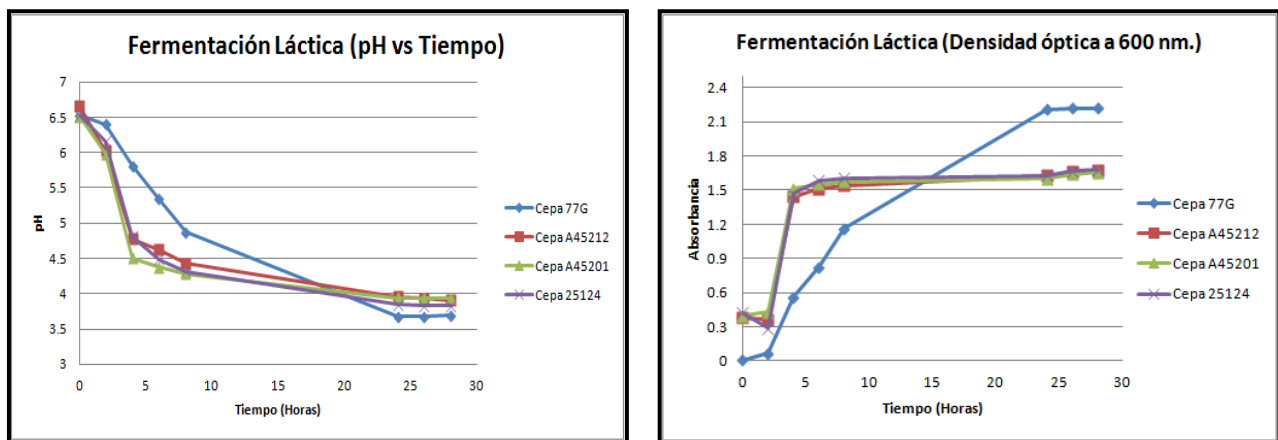


Figura 4.7. Gráfico del monitoreo del pH y Densidad óptica vs Tiempo para la fermentación Láctica.

En la Figura 4.7 se puede observar el grafico del crecimiento celular donde la fermentación láctica se fue dando de manera gradual.

De igual forma se presenta una estabilidad en el crecimiento en algunas cepas aproximadamente a las 10 y 25 horas transcurrida la fermentación pero en el caso particular de la cepa 77G el crecimiento celular fue gradual conforme transcurrió el tiempo. Dado los datos que se obtuvieron del monitoreo, se decidió trabajar con la cepa 77G, ya que fue la que obtuvo el valor de pH más bajo, el cual es el más deseado para la fermentación láctica en la extracción de antocianinas y la que mejor respuesta a la adaptación del medio fermentado respecto a su crecimiento celular presentó. Es importante señalar que el medio en el cual se trabajó fue para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido láctico. Este medio de cultivo permitió durante el desarrollo experimental un abundante desarrollo las especies de lactobacilos empleadas. Un dato importante que hay que mencionar es que la peptona y glucosa contribuyeron a la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportaron cofactores que inhibieron el desarrollo de algunos otros microorganismos. En particular el citrato de amonio actuó como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias gram negativas.

En resumen, los microorganismos de investigación son buenos productores de ácido láctico y como se ha mencionado anteriormente que a valores de pH bajos se extrae de manera más eficiente las antocianinas del pericarpio del maíz, la cepa 77G fue la seleccionada para realizar la extracción ya que a pesar de que fue la que más se tardó en acidificar el medio, alcanzó los valores de pH esperados y dentro de su crecimiento al medio de fermentación no se presentó una inhibición en su crecimiento.

**PARTE III: Determinación Cuantitativa**

**4.6. Cuantificación de Antocianinas Totales Monoméricas por pH-Diferencial:**

La concentración de antocianinas totales se determinó por el método diferencial de pH, según Wroslstad y otros en el 2005, basado en la reacción de estos compuestos ante cambios de pH en el medio. De las extracciones efectuadas por los métodos químicos que involucraron el uso de disolventes orgánicos y resinas hidrofóbicas, se obtienen para cada muestra dos extractos; uno en metanol ácido y otra en etanol ácido. Para el caso de la extracción con ácidos orgánicos se obtienen dos extractos; una en ácido láctico y otro en ácido acético glacial. Por el contrario, de la extracción efectuada asistida por una fermentación láctica se obtuvieron cinco extractos de cada uno de los modelos experimentales de la Sección 3.9.4.

**4.6.1. Métodos Químicos:**

**4.6.1.1. Extracción con Disolventes:**

En la Tabla 4.3.- se presentan los resultados obtenidos tras extraer las antocianinas del pericarpio y el olote del maíz morado con disolventes orgánicos.

**Tabla 4.3.- Antocianinas totales en el Maíz morado.**

<b>Cereal (Maíz) en MetOH</b>	
<b>Muestras</b>	<b>mg antocianinas/g de muestra</b>
<b>Pericarpio</b>	<b>0.8594 ± 0.2726</b>
<b>Olote</b>	<b>0.8944 ± 0.6708</b>
<b>Cereal (Maíz) en EtOH</b>	
<b>Muestras</b>	<b>mg antocianinas/g de muestra</b>
<b>Pericarpio</b>	<b>0.0981 ± 0.0258</b>
<b>Olote</b>	<b>0.3766 ± 0.1742</b>

Cuando las muestras se extrajeron con metanol ácido y se cuantificaron, se obtuvo como valor máximo la cantidad de 0.8944 mg/g de muestra seca en olote y como valor mínimo la cantidad de 0.8594 mg/g de muestra seca en el pericarpio del maíz morado, mientras que cuando la extracción se realizó con etanol ácido y se procedió a cuantificarlas, el valor máximo se obtuvo en el olote con una cantidad de 0.3766 mg/g de muestra seca y como valor mínimo la cantidad de 0.0981 mg/g de muestra seca en el pericarpio del maíz morado (Ver el gráfico de la Figura 4.8.).

Tanto el pericarpio y el olote del maíz morado se extraen mejor usando el sistema metanol/ácido acético (19:1 v/v). En estudios recientes, reportan la cantidad de 35.253 mg/g de muestra como valor máximo y la cantidad de 11.567 mg/g de muestra como mínimo del contenido total de antocianinas para 2.5 g de coronta<sup>19</sup> molida y tamizada del maíz morado tras una extracción en solución etanólica al 20% a pH=2 (Gorriti Gutierrez, y otros, 2009). Si se compara estos valores con los resultados obtenidos se observa que las concentraciones en las muestras analizadas son menores a lo reportado para este tipo de maíz.

#### 4.6.1.2. Extracción con Resinas Hidrofóbicas:

En la Tabla 4.4.- se presentan los resultados obtenidos de la extracción de antocianinas mediante resinas hidrofobicas para el pericarpio y olote del maíz morado.

**Tabla 4.4.- Antocianinas totales en el Maíz morado.**

Cereal (Maíz) en MetOH	
Muestras	mg antocianinas/g de muestra
Pericarpio	4.5644± 0.0123
Olote	14.3169 ± 0.2189
Cereal (Maíz) en EtOH	
Muestras	mg antocianinas/g de muestra
Pericarpio	27.2489 ± 0.7281
Olote	53.5339 ± 0.7005

Cuando los *Extractos CR* en metanol se trataron con resinas se obtuvo como valor máximo para el olote del maíz morado la cantidad de 14.3169 mg/g de muestra seca y como valor mínimo la cantidad de 4.5644 mg/g de muestra en base seca para el caso del pericarpio. Para los *Extractos CR* en etanol tratados con resina se obtuvo como valor máximo, la cantidad de 53.5359 mg/g de muestra seca en el olote del maíz morado y como valor mínimo la cantidad de 27.2489 mg/g de muestra seca en el caso del pericarpio. La variación de datos es muy grande entre el pericarpio y el olote y entre esta última también. Este comportamiento se puede atribuir a la selectividad de la resina por algún tipo de antocianina presente en el extracto, esto último únicamente en el caso del olote ya que en ambos disolventes fue la muestra en la que se obtuvo los valores más altos (Ver el gráfico de la Figura 4.8.).

<sup>19</sup> Raquis grueso y firme que constituye el eje de la espiga que conforma la mazorca de maíz.

Sin embargo, hay que destacar que la manipulación de la muestra y la pérdida de colorante que se pudiera estar sucediendo en los lavados de resinas en donde la afinidad de estas últimas por los disolventes de extracción no arrastre la antocianina y esta última se quede impregnada en la matriz de la resina. En resumen el uso de resinas hidrofóbicas tras un tratamiento de extracción con disolventes orgánicos en ácido para el maíz morado solo es efectiva si se emplea en el olote.

Para este tipo de extracción, (Salinas Moreno y otros, 2005) reportan la cantidad de 259.4 mg/g de antocianinas totales en el pericarpio del maíz morado tras ser extraídos mediante disolventes orgánicos ácidos; metanol y etanol ácido purificados en columnas de Amberlita y Sephadex. Si se comparan los resultados obtenidos con estos datos se observa que las concentraciones en las muestras analizadas son menores a lo reportado para este tipo de maíz. Factores importantes atribuidos a este resultado es la variedad del maíz empleado y las condiciones durante el proceso de extracción.

#### 4.6.1.3. Extracción con Ácidos Orgánicos:

En la Tabla 4.5.- se presentan los resultados obtenidos tras extraer las antocianinas del pericarpio y el olote del maíz morado empleando ácidos orgánicos.

**Tabla 4.5.- Antocianinas totales en el Maíz morado.**

<b>Cereal (Maíz) en Ácido láctico</b>	
<b>Muestras</b>	<b>mg antocianinas/g de muestra</b>
<b>Pericarpio</b>	<b>5.3731 ± 0.4080</b>
<b>Olote</b>	<b>5.2725 ± 0.5609</b>
<b>Cereal (Maíz) en Ácido acético glacial</b>	
<b>Muestras</b>	<b>mg antocianinas/g de muestra</b>
<b>Pericarpio</b>	<b>3.5199 ± 0.2545</b>
<b>Olote</b>	<b>5.5404 ± 0.3728</b>

Cuando la muestra se extrajo con ácido láctico se obtuvo como valor máximo la cantidad de 5.3731 mg/g de muestra seca en pericarpio y como mínimo, la cantidad 5.2725 mg/g de muestra seca en el olote del maíz morado mientras que cuando la extracción se realizó con ácido acético glacial, el valor máximo se obtuvo en el olote con un valor máximo de 5.5404 mg/g de muestra seca y como valor mínimo la cantidad de 3.5199 mg/g de muestra seca en el pericarpio del maíz morado, en general las dos soluciones empleadas al 1% de ácido láctico y ácido acético son buenas como soluciones extractantes.



El comportamiento tras la extracción con ácidos orgánicos pone en evidencia que se favorece la estabilidad de las antocianinas, por lo tanto se tiene una mayor cuantificación de estas últimas ya que este tipo de compuestos están en función del pH (Ver el gráfico de la Figura 4.8.). El autor (Yang 2007), en un trabajo relacionado con la optimización de extracción de antocianinas de corontas de maíz morado de un cultivar de la China en soluciones etanólicas y metanólicas en medio ácido acondicionados con ácido acético y cítrico, encontró valores cercanos a 6 mg/g muestra (5,90 mg de antocianina/g muestra) según su diseño factorial, ese mismo año (Yang 2007) en otra investigación relacionada con la cinética de degradación térmica de antocianinas del maíz morado en medio acuoso encontró el valor de 0,680 mg de antocianina/g muestra, en ambos casos los valores fueron similares a los hallados en la investigación. Por otro lado, (Escribano-Bailón, 2004) en una revisión de antocianinas en cereales mencionó contenidos de 1642 mg/100g en base húmeda para el maíz morado y 1779 mg/100g en base seca, superiores a los encontrados en esta investigación.

En resumen, si se emplean soluciones de ácido láctico para extraer antocianinas del maíz morado se obtienen valores representativos tanto para el pericarpio y el olote del maíz morado mientras que con el uso de soluciones con ácido acético glacial arroja un variabilidad entre la extracción con el pericarpio y el olote del maíz morado, esto es principalmente a la afinidad de las antocianinas sobre la composición química de la solución en ácido láctico, la concentración empleada para la extracción, donde se observa que para obtener valores semejantes a los obtenidos empleado una solución de ácido láctico, se requeriría concentraciones mayores al 10% y por último, el daño estructural provocado en la molécula con la posible fragmentación de esta última tras haberse extraerse el compuesto con tratamientos agresivos, esto es, ocupando soluciones acidas por 24 horas en agitación constante en donde ya no es factible la cuantificación por el método de pH-Diferencial. Lo anterior indica que conviene controlar la variabilidad del pH con soluciones buffer y encontrar un pH óptimo de extracción preferentemente en un intervalo de 2 hasta 3.5 en que se obtenga la mayor cantidad de antocianinas.

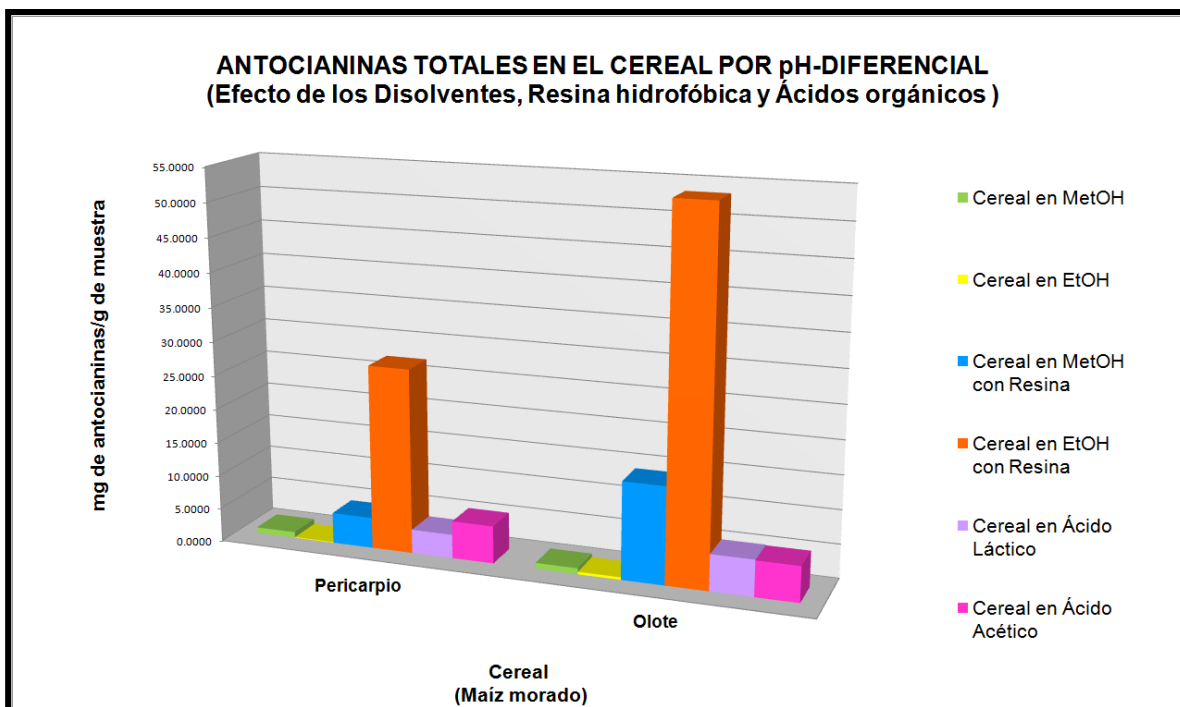


Figura 4.8. Cuantificación total de antocianinas en el Pericarpio y el Olote del maíz morado por pH diferencial mediante disolventes, resinas hidrofóbicas y ácidos orgánicos.

En el gráfico de la Figura 4.8., se observa de manera global el comportamiento de las extracciones empleando métodos convencionales y no convencionales para obtener soluciones enriquecidas en antocianinas principalmente en cianidina-3-glucósido.

Dentro de los métodos convencionales como lo es el uso de disolventes acidificados y soluciones ácidas, se tienen valores semejantes entre ellos pero muy por debajo de los obtenidos tras una repurificación con resinas hidrofóbicas. Otro dato importante que se observa es el empleo de metanol es mejor tanto en el pericarpio como en el olote que el etanol como solución extractante. Para el caso de las soluciones ácidas se observa que en el caso del pericarpio, la extracción empleando ácido láctico se obtienen valores más altos que con el ácido acético. Con respecto al olote ambos ácidos resultan ser buenas soluciones extractantes ya que no se observa gran variación. Otro aspecto importante de este gráfico es que el uso de métodos no convencionales como es el caso del empleo de resinas hidrofóbicas, se incrementa en más de un 30% la cantidad total de antocianinas extraídas del olote tratado con etanol previamente que de uno en metanol; es decir, se observa una mejora significativa en el proceso extracción con una repurificación.

Estos resultados como ya se había mencionado anteriormente se sugiere que el proceso de extracción para obtener cianidina-3-glucósido requiere de un método convencional en metanol o etanol dependiendo de la muestra ya que tras un proceso de repurificación el compuesto se ve favorecido con el uso de resinas siempre y cuando se mantenga un pH ácido. La extracción con ácidos orgánicos permitió observar que tanto más se estaban extrayendo las antocianinas ya sea con este método ó empleando disolventes acidificados. Los resultados muestran que no hay gran variación pero si sugiere un modelo de extracción en el que se controle el intervalo de variación del pH y la atmosfera y evidentemente el proceso de repurificación.

#### 4.6.2. Extracción auxiliada por una fermentación Láctica:

En la Tabla 4.6.- se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación total de antocianinas monoméricas tras la fermentación láctica del pericarpio irradiado del maíz morado.

**Tabla 4.6.- Antocianinas totales de la Fermentación Láctica.**

Pericarpio de Maíz morado					
Muestras	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Control 1	Control 2
mg antocianinas/g de muestra	0.2096	0.0935	0.2263	19.6012	10.5134
Desviación estándar	±0.0726	±0.0668	±0.0776	±0.4124	±0.3888

El valor más alto se obtuvo extrayendo las antocianinas mediante disolventes orgánicos (metanol), este último sirvió de partida para los demás modelos ya que valores por debajo de este estarían hablando de otro tipo de variables a ser consideradas.

Los valores en las que el contenido de antocianinas totales debió ser mayor, solo se obtuvo únicamente la cantidad de 0.2263 mg/g de muestra contra 19.6012 mg/g de muestra en base seca cuando se extrajo con metanol ácido. En los casos en los que se adicionó pericarpio y se inoculó la cepa, se obtuvieron valores de 0.2060 mg/g de muestra en base seca y por último en el extracto que se trabajó únicamente con el pericarpio y el medio, se obtuvo únicamente la cantidad 0.2096 mg/g de muestra en base seca.

Es evidente que aún hace falta mucho por trabajar en el modelo fermentativo del pericarpio ya que los resultados que se obtuvieron están por debajo de los controles, lo cual indica que hay factores importantes que están influyendo de manera significativa en alguna etapa del modelo experimental como puede ser: la cantidad de oxígeno, de pericarpio, el pretratamiento antes de iniciar la fermentación, el medio de fermentación, la toma de muestra, la interacción del compuesto de interés con el microorganismo a nivel intracelular, la estabilidad de las antocianinas en el medio, su liberación del medio, la composición como tal del pericarpio que quizás esta inhibiendo el crecimiento del microorganismo, la luz, la agitación entre otros (Wacher-Rodarte, 1993).

#### 4.7. Cuantificación de Antocianinas por HPLC:

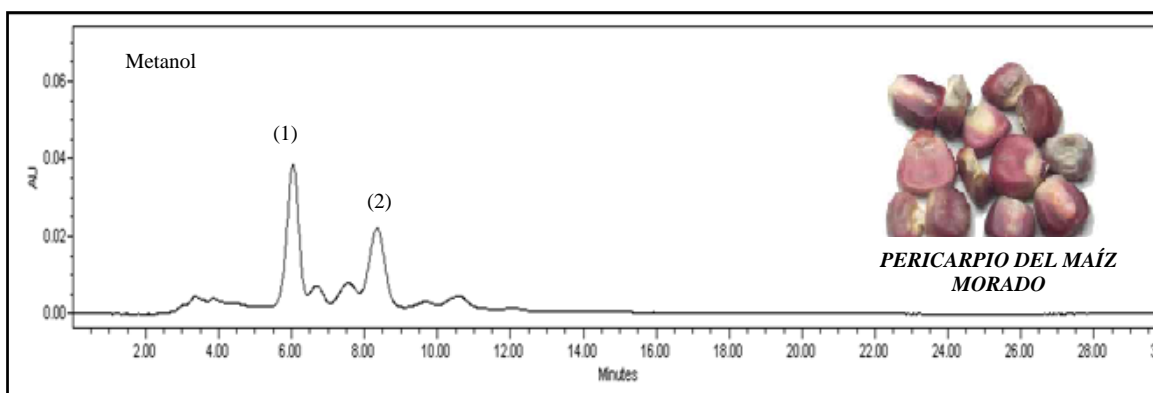
Se determinó la cantidad de cianidina-3-glucósido por triplicado (n=3) de los extractos purificados de la Sección 3.8.3. por gramo de muestra seca mediante HPLC.

##### 4.7.1. Métodos Químicos:

##### 4.7.1.1. Resinas Hidrofóbicas:

A continuación en los gráficos de las Figuras 4.13. y 4.14. se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación de cianidina-3-glucósido en los **Extractos CR2** mediante HPLC.

##### ➤ Pericarpio del maíz morado:



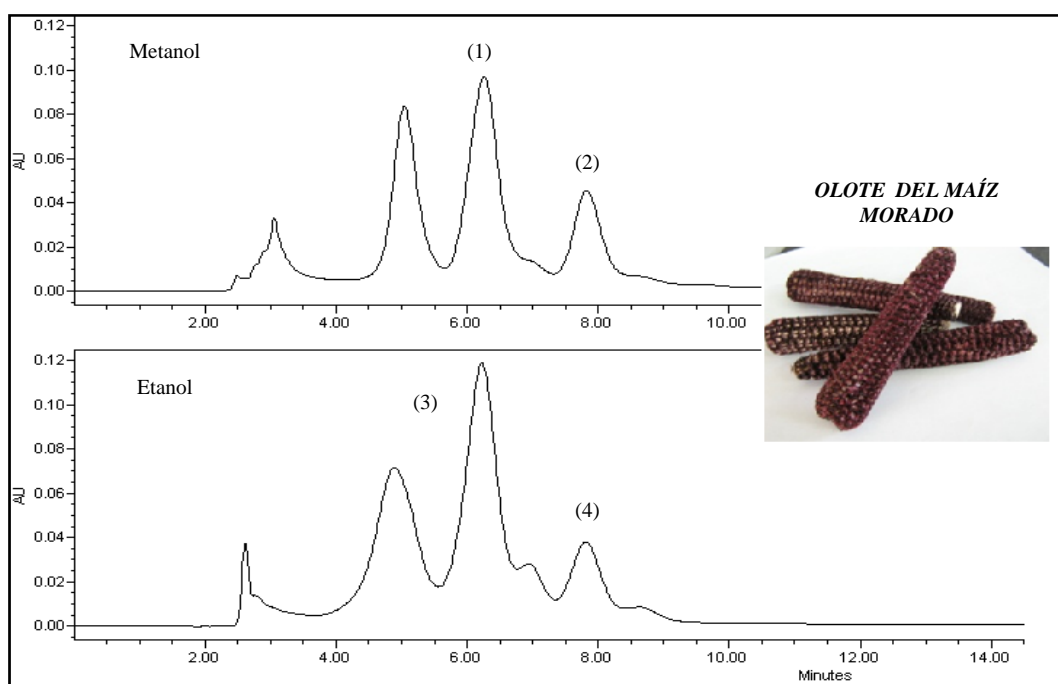
(1). Cianidina-3-glucósido del extracto en MetOH y (2). Posible Peonidina-3-glucósido.

Pericarpio	Tiempo de retención (Tr) en minutos	mg de cianidina/g de muestra seca	Desviación estándar
MetOH	6.03	0.0251	±0.0146

Figura 4.9. Cromatograma N°1: Concentración de cianidina-3-glucósido en el Pericarpio de Maíz morado (*Zea mays*).

Con la cuantificación mediante HPLC, se tuvo que del total de antocianinas solo 0.0251 mg/g de muestra en base seca del extracto en metanol ácido correspondieron específicamente para la cianidina 3-glucósido dando la señal en un tiempo de retención de 6.03 minutos mientras que para el extracto en etanol no se detectó la presencia de dicho compuesto. La investigación desarrollada por (Pedreschi y Cisneros-Zevallos 2007) sobre antocianinas de un extracto comercial de antocianinas del maíz morado proveniente de Perú, determinó contenidos de antocianina/g de la fracción acuosa según HPLC-DAD en los niveles de 15.43 mg de cianidina 3-glucósido y 10.37 mg de cianidina acilada 3-glucósido/g de un total de 40,25 mg de antocianinas/g de dicho extracto, valor superior a los encontrados en esta investigación.

➤ **Olote del maíz morado:**



(1). Cianidina-3-glucósido del extracto en MetOH, (3). Cianidina-3-glucósido del extracto en EtOH, (2). y (4). Posible Peonidina-3-glucósido.

Olote	Tiempo de retención (Tr) en minutos	mg de cianidina/g de muestra seca	Desviación estándar
MetOH	6.2695	1.4262	±0.5209
EtOH	6.2425	0.4447	±0.2215

Figura 4.10. Cromatograma N°2: Concentración de cianidina-3-glucósido en el Olote del Maíz morado (Zea mays).

En la cuantificación mediante HPLC, se tuvo que del total de antocianinas solo 1.4262 mg/g de muestra en base seca del extracto en metanol correspondieron específicamente para la cianidina 3-glucósido como valor máximo, dando la señal en un tiempo de retención de 6.26 minutos.

En resumen, en el maíz, pueden formarse dos clases de antocianinas principalmente y su producción está regulada por varios genes independientes. Las 3-hidroxi-antocianinas pueden ser formadas en casi todos los tejidos de la planta de maíz, mientras que la formación de 3-desoxiantocianinas está restringida al pericarpio y los estambres de las flores (Halbwirth, 2003). Se ha reportado la presencia de cianidina 3-glucósido en la testa de las semillas, mazorcas, hojas y en general a través de las plantas.

Se ha detectado cianidina 3-galactósido acilada con ácido p-cumárico en semillas de maíz peruano oscuro y junto con cianidina 3-glucósido, aglicona libre y cianidina en hojas de maíz híbrido (Baraud, 1974). México cuenta con una gran cantidad de variedades de maíz que presentan granos de colores morados, azules, rojos y guindas. En estos últimos el pigmento se localiza tanto en el pericarpio como en la capa de aleurona y el contenido de antocianinas en el grano llega a ser hasta 1.151 mg/g de muestra. Por otra parte, (Fossen y otros, 1998) reportan que con pH alcalino, el anillo de piridio de la antocianina se rompe y el color azul desaparece para dar paso a una coloración amarilla pálida, que es representativa de la chalcona ionizada.

## **PARTE IV: Cianidina-3-glucósido**

### **4.8. Optimización de Extracción a Escala Preparativa:**

Para determinar las condiciones óptimas de extracción por tecnologías limpias, para obtener cianidina-3-glucósido, se realizaron: extracciones con disolventes orgánicos, resinas hidrofóbicas, ácidos orgánicos y la asistencia en la extracción mediante una fermentación láctica. En cada experimento realizado se utilizó como muestra problema el pericarpio y olote del maíz morado, este último por haber presentado un contenido potencial en el contenido de antocianinas a través del *screening* de fuentes vegetales y su posterior identificación cualitativa por cromatografía en capa fina.

De los tres procesos de extracción por métodos químicos se obtuvo que el mejor para obtener un extracto enriquecido en antocianinas fue aquel en el que se emplearon disolventes orgánicos específicamente utilizando metanol en ácido acético ya que mediante ácidos orgánicos se obtienen valores cuantitativamente similares pero no tan elevados y asistiendo la extracción mediante la fermentación láctica del pericarpio del maíz se obtienen valores por debajo de los esperados. Como ya se ha mencionado anteriormente este tipo de extractos además de estar enriquecidos en compuestos fenólicos también lo están en otro tipo de componentes, principalmente azúcares y ácidos orgánicos, es por eso que se lleva a cabo un proceso de lavado con acetato de etilo para eliminar una gran parte de dichos ácidos sin embargo, la presencia de azúcares aun es significativa es así que el empleo de resinas hidrofóbicas funge principalmente en eliminarlos creando una matriz en la que el extracto colorido se queda absorbido por afinidad iónica en la que mediante lavados acuosos se pueden eliminar las impurezas y a su vez tras su recuperación se obtienen extractos con antocianinas específicas afines a la resina empleada que para el caso práctico de esta investigación es la cianidina-3-glucósido. En los resultados obtenidos con el maíz morado se observa una buena extracción con los disolventes orgánicos pero una mejora parcial en la cantidad total de antocianinas monoméricas empleando resinas hidrofóbicas tras su purificación que con un análisis cuantitativo de la cantidad de cianidina-3-glucósidos mediante HPLC, se observa que este es un método que permite obtener significativamente el compuesto. Se procedió a unificar y optimizar el proceso de extracción para obtener a escala preparativa un extracto enriquecido en cianidina-3-glucósido en las siguientes fuentes vegetales resultantes del *screening* como fuentes potenciales en el contenido antocianídico: ciruela, frambuesa, mora azul, frambuesa y hojas de ciruelo, en 25 gramos de muestra que se trataron mediante la extracción con métodos químicos: (disolventes orgánicos [**Extractos SR2**] y resinas hidrofóbicas [**Extractos CR2**]) de la Sección 3.12.

En la Tabla 4.7.- se muestran los resultados obtenidos tras extraer antocianinas de las muestras de ciruela, frambuesa, mora azul y zarzamora por triplicado.

**Tabla 4.7.- Antocianinas totales en Frutos.**

Frutos en MetOH	
Muestras	mg antocianinas/g de muestra
Ciruela	0.7768 ± 0.1225
Frambuesa	0.3384 ± 0.1167
Mora azul	0.0903 ± 0.0231
Zarzamora	1.0915 ± 0.0631
Frutos en EtOH	
Muestras	mg antocianinas/g de muestra
Ciruela	0.8055 ± 0.0531
Frambuesa	0.2585 ± 0.0563
Mora azul	1.0022 ± 0.5326
Zarzamora	0.8312 ± 0.1456

Los valores máximos tras la extracción con metanol ácido fueron para el extracto de zarzamora con 1.0915 mg/g de muestra húmeda, fresa con 0.9003 mg/g de muestra y por último la ciruela con 0.7768 mg/g de muestra mientras que el valor mínimo de la extracción con metanol ácido se obtuvo con la mora azul con la cantidad de 0.0903 mg/g de muestra en base húmeda.

En el caso de los extractos en etanol ácido, los valores máximos obtenidos en la extracción lo presentaron la mora azul con 1.0022 mg/g de muestra seguido la zarzamora con 0.8312 mg/g de muestra y finalmente la ciruela con 0.8055 mg/g de muestra en base húmeda. El valor mínimo de la extracción con etanol ácido lo obtuvo el extracto de frambuesa con 0.2585 mg/g de muestra en base seca.

En los extractos de las frutillas como la frambuesa, la mora azul y la zarzamora se observa una mayor variabilidad de resultados entre los disolventes empleados como extractantes mientras que para el caso de la ciruela ambos disolventes ya sea metanol o etanol resulta ser un buen sistema de extracción para antocianinas. En los estudios realizados por (Clifford, 2000), reportan para los siguientes frutos las siguientes cantidades en miligramos de antocianinas por gramo de muestra: Ciruela (0.2 a 0.25 mg/g), Frambuesa (0.2 a 0.6 mg/g), Mora azul (1.15 mg/g) y Zarzamora (1.7 a 4.27 mg/g), comparando estos datos con los realizados en esta investigación se encuentra que están dentro del intervalo.



En resumen dependiendo del fruto y el disolvente orgánico ácido empleado para la extracción de antocianinas influirá en el resultado obtenido ya que como se muestran en los resultados hay frutos que se extraen mayoritariamente empleando metanol ácido que etanol ácido y viceversa, el punto está en seleccionar más la parte del fruto con la que se va a trabajar para acotar más la búsqueda de la antocianina de interés (Ver Gráfico de la Figura 4.11.).

En la Tabla 4.8.- se presentan los resultados obtenidos tras la extracción de antocianinas con disolventes orgánicos en las hojas de ciruelo por triplicado.

**Tabla 4.8.- Antocianinas totales en Otras Fuentes Vegetales.**

Fuente Vegetal en MetOH	
Muestras	mg antocianinas/g de muestra
Hojas de Ciruelo	0.2583 ± 0.7728
Fuente vegetal en EtOH	
Muestras	mg antocianinas/g de muestra
Hojas de Ciruelo	4.32759 ± 0.4076

De las hojas de ciruelo tras cuantificar las antocianinas totales se obtuvo con la extracción en etanol ácido el valor máximo de 4.32759 mg/g de muestra en base seca y como valor mínimo 0.2583 mg/g de muestra en base seca cuando la muestra se extrajo con metanol ácido. Hay muchos factores que se pueden tomar en cuenta para explicar estos resultados, el primero que resalta es el tipo de fuente vegetal con la que se estuvo trabajando ya que a diferencia de las demás, en particular esta estaba compuesta por la parte secundaria del fruto en general; es decir, las hojas. Otro factor importante es el tipo de antocianinas presentes en la muestra vegetal y la unión que estas últimas tienen a su vez con otras moléculas ocasionando en conjunto una mayor selectividad en cuanto a su afinidad molecular cuando se emplea metanol ácido, siendo este último con el que se obtuvo la mayor cantidad. Por último pero no menos importante es la manipulación del extracto durante todo el proceso de extracción ya que la muestra pasa por una etapa de lavado con acetato de etilo en la cual se pudo perder parte del colorante. En resumen, para el caso particular de las hojas de ciruelo, se extrajo de manera mayoritaria la cantidad de antocianinas totales empleando metanol/ácido acético glacial (19:1 v/v), (Ver Gráfico de la Figura 4.12).

En la Tabla 4.9- se muestran los resultados obtenidos tras la extracción de antocianinas con resinas hidrofobicas de los **Extractos SR2** de la ciruela, frambuesa, mora azul, y zarzamora, por triplicado.

**Tabla 4.9.- Antocianinas totales en Frutos.**

Frutos en MetOH	
Muestras	mg antocianinas/g de muestra
Ciruela	2.5888 ± 0.8618
Frambuesa	19.7611 ± 0.1731
Mora azul	19.3181 ± 0.0398
Zarzamora	16.3177 ± 1.3491
Frutos en EtOH	
Muestras	mg antocianinas/g de muestra
Ciruela	3.8252 ± 0.0546
Frambuesa	20.9418 ± 0.8460
Mora azul	14.6798 ± 0.7128
Zarzamora	10.0215 ± 0.1864

Los valores máximos de las extracciones con resina de los *Extractos SR2* en metanol, fueron para los extractos de frambuesa con 19.7611 mg/g de muestra, la mora azul con 19.3181 mg/g de muestra y por último la zarzamora con 16.3177 mg/g de muestra todas en base húmeda. El valor mínimo de la extracción con resina del Extracto SR en metanol ácido lo obtuvo el extracto uva con 1.1858 mg/g de muestra en base húmeda. En el caso de la extracción con resinas de los *Extractos SR2* en etanol ácido, los valores máximos obtenidos los presentaron los extractos de frambuesa con 20.9418 mg/g de muestra seguido la mora azul con 14.6798 mg/g de muestra y finalmente la zarzamora con 10.0215 mg/g de muestra todas en base húmeda. El valor mínimo de la extracción con resina de los *Extractos SR2* en etanol ácido, lo obtuvo el extracto de uva con 1.4967 mg/g de muestra húmeda. La mayor cantidad de antocianinas monoméricas recuperadas en ambos disolventes como extractantes y purificados con resina se obtuvo en los extractos de frambuesa, mora azul y zarzamora, mientras que los datos minoritarios lo obtuvieron los extractos de ciruela, fresa y uva, estos últimos otro tipo de frutillas. En resumen la extracción de antocianinas con resina en extractos enriquecidos en antocianinas con extractantes ácidos como el metanol o etanol favorece la selectividad mayoritaria hacia las antocianinas de las frutillas ya mencionadas mientras que para otro tipo de frutos la selectividad es menor pero sin embargo el proceso de extracción se sigue efectuando (Ver Gráfico de la Figura 4.11.).

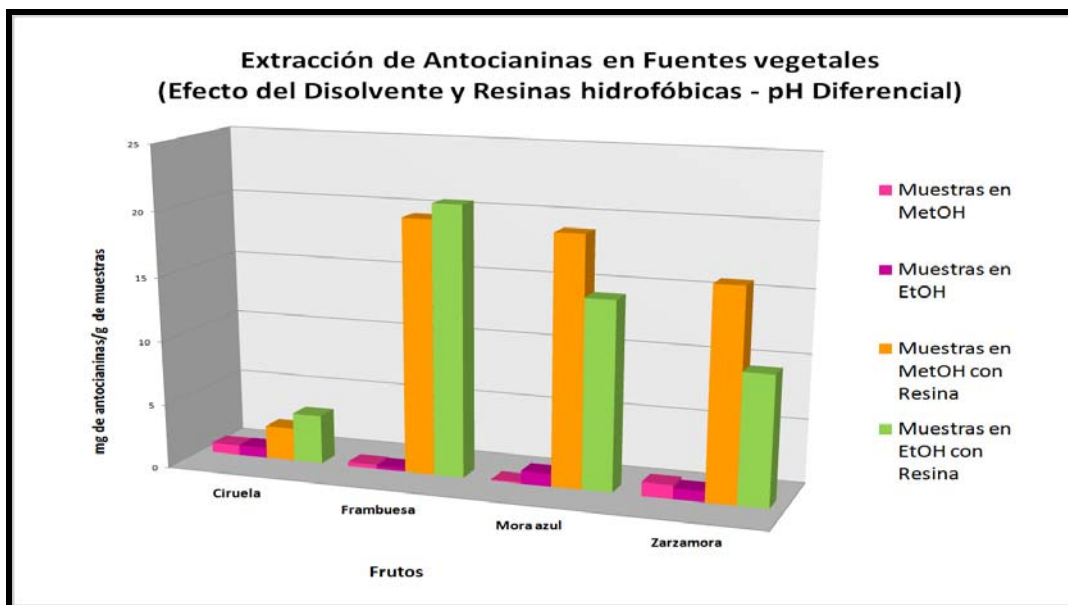


Figura 4.11. Contenido total de antocianinas para muestras tratadas con resina y sin resina en fuentes vegetales (Frutos y Hortalizas).

En la Tabla 4.10.- se presentan los resultados obtenidos tras la extracción de antocianinas con resinas hidrofobicas en los **Extractos SR** de las hojas de ciruelo por triplicado.

Tabla 4.10.- Antocianinas totales en Otras Fuentes Vegetales.

Fuente Vegetal en MetOH	
Muestras	mg antocianinas/g de muestra
Hojas de Ciruelo	106.9033 ± 0.4837
Fuente vegetal en EtOH	
Muestras	mg antocianinas/g de muestra
Hojas de Ciruelo	96.6856 ± 0.5113

El valor máximo de la cuantificación de antocianinas totales tras la extracción del extracto de la muestra con resinas hidrofóbicas, lo obtuvo aquel en metanol ácido con un valor de 106.9033 mg/g de muestra en base seca mientras que el valor mínimo lo presentó el extracto en metanol ácido con 96.6856 mg/g de muestra en base seca. En general la resina Amberlita resulta efectiva si se desea extraer antocianinas totales de extractos enriquecidos en estas últimas con disolventes ácidos; es decir, la composición de compuestos fenólicos en esta fuente vegetal es afín a la matriz molecular de la resina. De manera general en la etapa de extracción para las diferentes fuentes vegetales que comprendieron frutos, hojas y hortalizas se realizó un grafico (Ver Figura 4.12.) para englobar los resultados en los que se muestra el comportamiento en general que se obtuvo en las muestras.

Se puede observar que los valores más representativos de la cantidad de antocianinas mediante la extracción con métodos químicos fueron aquellas muestras que se extrajeron con resina tras haberse tratado con disolventes orgánicos en soluciones ácidas con ácido acético glacial. De estas últimas los valores máximos lo obtuvieron las frutillas frambuesa, mora azul y zarzamora. Para el caso de las hojas de ciruelo se muestra en el gráfico de la Figura 4.12., no hay una diferencia entre el uso de resinas hidrofóbicas y la extracción simple con disolventes ácidos. Por lo tanto las muestras seleccionadas para cuantificar la cantidad de cianidina-3-glucósido fueron frambuesa, mora azul, zarzamora y las hojas de ciruelo. Como referencia de búsqueda se tomará el extracto de ciruela ya que como se reporta en la literatura ésta contiene mayoritariamente la cantidad del compuesto de interés.

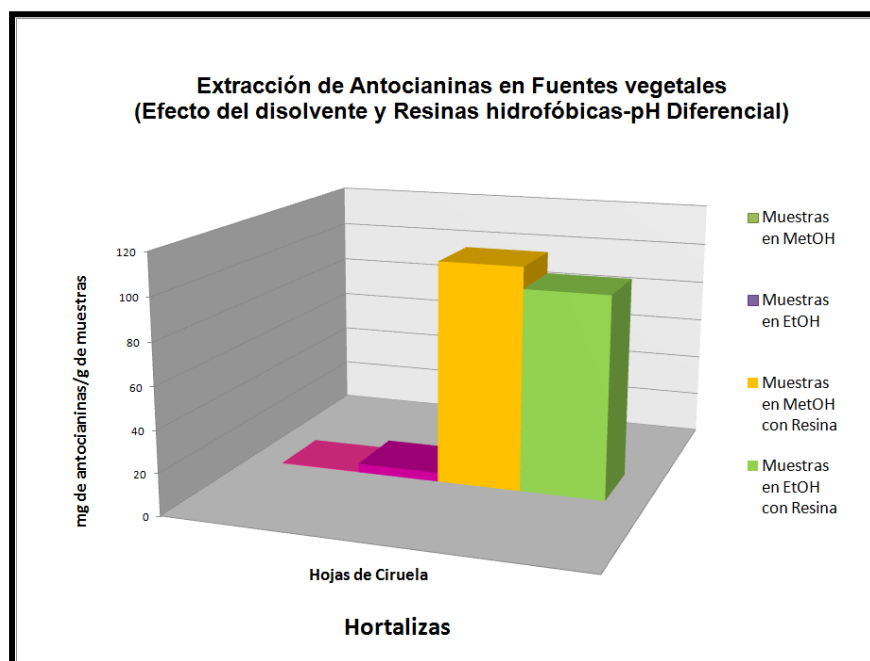
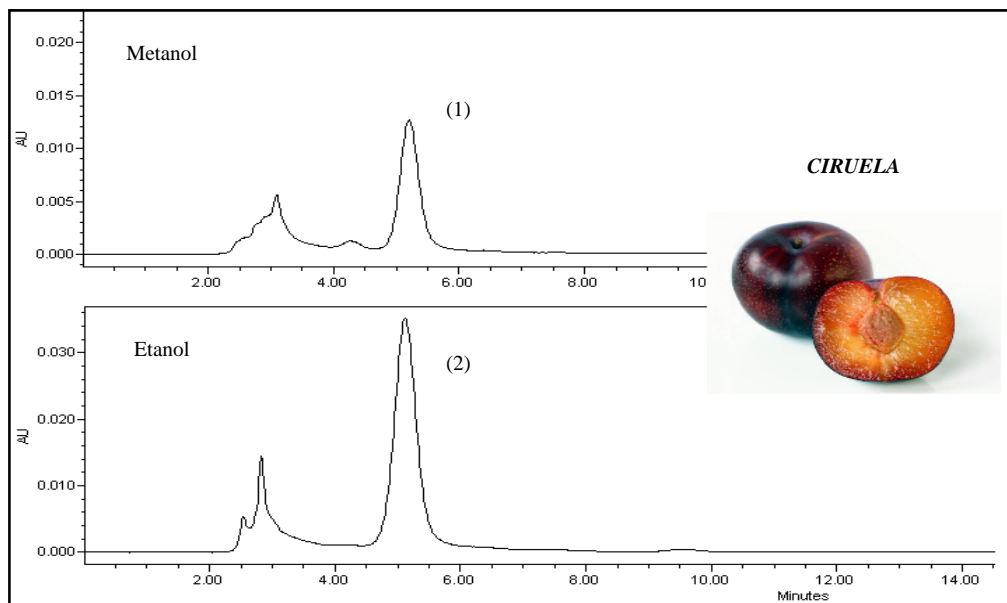


Figura 4.12. Contenido total de antocianinas para muestras tratadas con resina y sin resina en otras Fuentes Vegetales.

**4.8.1. Identificación de Cianidina 3-Glucósido:**

En los cromatogramas de las Figuras 4.13. a 4.17., se presentan los resultados obtenidos del análisis cuantitativo de la concentración de cianidina-3-glucósido en los **Extractos CR2** de la ciruela, frambuesa, mora azul y frambuesa mediante HPLC:

• **Ciruela:**



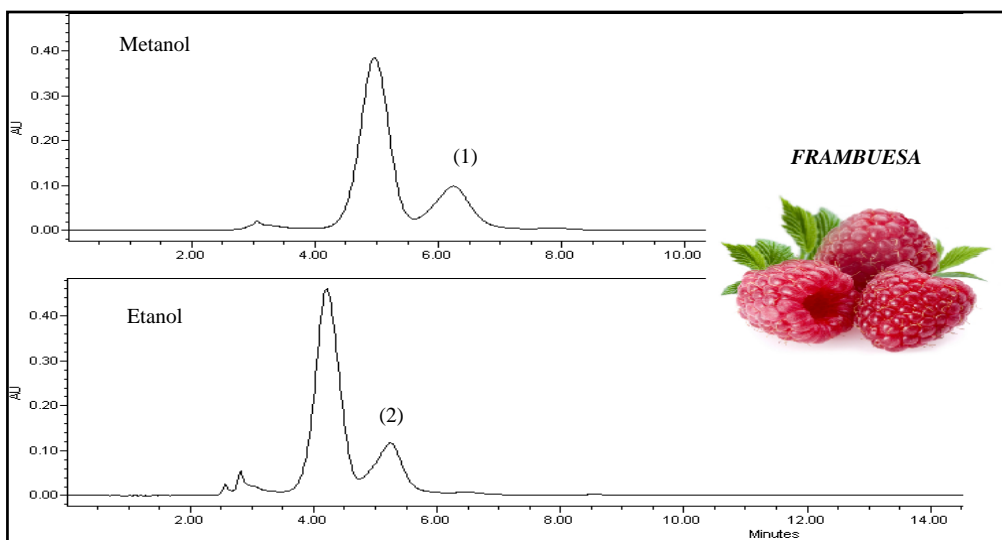
(1). Cianidina-3-glucósido del extracto en MetOH y (2). Cianidina-3-glucósido del extracto en EtOH

Ciruela	Tiempo de retención (Tr) en minutos	mg de cianidina/g de muestra fresca	Desviación estándar
MetOH	4.9275	0.0387	±0.0041
EtOH	4.6360	0.0636	±0.0517

Figura 4.13. Cromatograma N°3: Concentración de cianidina-3-glucósido en Ciruela (*Prunus domestica L.*).

De manera general se tiene que cuando la Ciruela se extrajo con disolventes, el valor más representativo de la cantidad total de antocianinas fue mediante la extracción con etanol (0.8055 mg/g) y mediante las resinas hidrofóbicas (3.8352 mg/g). Finalmente con la cuantificación por HPLC, se tuvo que del total de antocianinas, 0.0636 mg/g de muestra fresca en etanol correspondieron específicamente para la cianidina 3-glucósido como valor máximo dando la señal en un tiempo de retención a 4.63 minutos de corrida.

• **Frambuesa:**



(1). Cianidina-3-glucósido del extracto en MetOH y (2). Cianidina-3-glucósido del extracto en EtOH

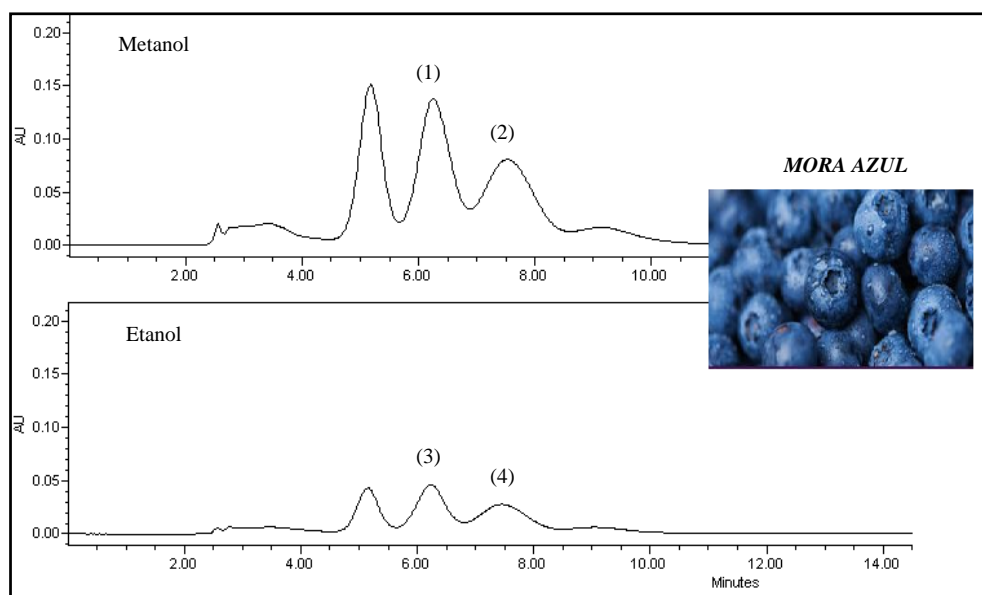
Frambuesa	Tiempo de retención (Tr) en minutos	mg de cianidina/g de muestra fresca	Desviación estándar
MetOH	6.2935	0.0397	±0.0377
EtOH	6.475	0.0070	±0.0430

Figura 4.14. Cromatograma N°4 y concentración de cianidina 3-glucósido en Frambuesa (*Rubus idaeus*).

Cuando el extracto de Frambuesa se extrajo con disolventes, el valor más representativo de la cantidad total de antocianinas fue mediante la extracción con metanol (0.33384 mg/g) y mediante las resinas hidrofóbicas (20.9418 mg/g) empleando etanol. Finalmente con la cuantificación por HPLC, se tuvo que del total de antocianinas, 0.0397 mg/g de muestra fresca en metanol correspondieron específicamente para la cianidina 3-glucósido como valor máximo dando la señal en un tiempo de retención a 6.29 minutos de corrida. De forma similar a la zarzamora, los derivados de cianidina también predominan en las frambuesas negras y rojas, pero sus perfiles son bastante distintos debido a diferencias genéticas. Las antocianinas en las frambuesas negras y rojas están presentes exclusivamente en forma no acilada. En términos de grado de glicosilación, los porcentajes de monoglicósidos, diglicósidos y triglicósidos en las frambuesas negras y rojas se reportan como 13%, 64% y 23%, así como 22%, 52% y 26%, respectivamente.

Las 7 antocianinas identificadas en la frambuesa roja incluyen cianidina-3-soforósido, cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinosido, pelargonidina-3-glucósido, pelargonidina-3-rutinosido, cianidina-3-soforosido-5-ramnósido y cianidina-3-sambuniósido-5-ramnósido. La frambuesa negra contiene todas las antocianinas encontradas en la frambuesa roja, con la excepción de que carece de cianidina-3-soforósido, pero contiene cianidina-3-sambubiósido y peonidina-3-rutinosido. Las frambuesas son únicas porque tanto los frutos negros como los rojos contienen el trisacárido cianidina-3-sambubiósido-5-ramnósido, mientras que cianidina-3-soforósido-5-ramnósido está presente solamente en el fruto rojo. Cianidina-3-soforósido es la principal antocianina encontrada en las frambuesas rojas, seguida de cianidina-3-soforósido-5-ramnósido y cianidina-3-glucósido, mientras que cianidina-3-rutinosido es la antocianina predominante en las frambuesas negras, seguida de cianidina-3-sambubiósido-5-ramnósido y cianidina-4-glucósido (Edid, 2011).

• **Mora azul:**



(1). Cianidina-3-glucósido del extracto en MetOH, (3). Cianidina-3-glucósido del extracto en EtOH, (2). y (4). Posible Peonidina-3-glucósido.

Mora Azul	Tiempo de retención (Tr) en minutos	mg de cianidina/g de muestra fresca	Desviación estándar
MetOH	7.0710	0.0179	±0.0031
EtOH	6.9965	0.0088	±0.0023

Figura 4.15. Cromatograma N°5: Concentración de cianidina-3-glucósido en Mora azul (*Vaccinium corymbosum*).

Para el caso de la Mora azul cuando se extrajo con disolventes, el valor más representativo de la cantidad total de antocianinas se obtuvo mediante la extracción con etanol (1.0022 mg/g) y mediante las resinas hidrofóbicas (19.3181 mg/g) con metanol. Finalmente con la cuantificación por HPLC, se tuvo que del total de antocianinas, 0.0179 mg/g de muestra fresca en metanol correspondieron específicamente para la cianidina 3-glucósido como valor máximo dando la señal en un tiempo de retención de 7.07 minutos. Las moras azules son un fruto de baya único porque contienen los monoglicósidos (glucósidos, galactósidos y arabinósidos) de delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina.

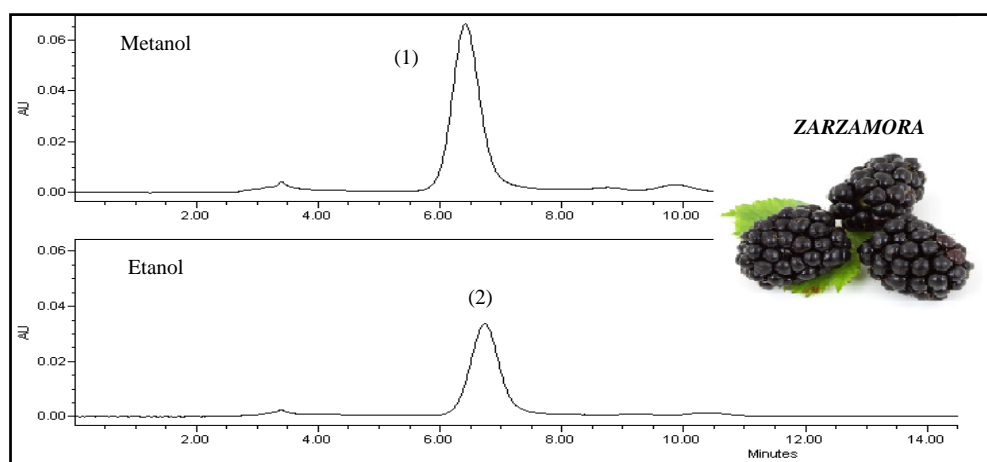
Debido a la diversidad de monoglicósidos y a la acilación con ácidos alifáticos tales como el acético y el malónico, se han identificado más de 25 antocianinas en las moras azules. La composición y contenido de antocianinas en la mora azul está influenciada por la genética. De acuerdo a un estudio, la distribución porcentual de antocianinas monoméricas en 5 genotipos de mora azul fue delphinidina (27% a 40%), malvidina (22% a 33%), petunidina (19% a 26%), cianidina (6% a 14%) y peonidina (1% a 5%), mientras que la distribución de antocianinas aciladas fue de no detectable al 9%. En términos de la distribución porcentual de glicósidos de antocianina, los galactósidos constituyeron del 60% al 67%, los arabinósidos del 26% al 32% y los glucósidos del 2% al 29%. Interesantemente, 4 genotipos 'Southern Highbush' contuvieron niveles elevados de galactósidos y arabinósidos, así como bajos niveles de glucósidos, mientras que Bluecrop, un genotipo 'Northern Highbush', contuvo niveles similares de los tres glicósidos, indicando que la síntesis de transferasas involucradas en la unión de entidades azúcar específicas es coordinada genéticamente.

El efecto de la genética en la composición de antocianinas aciladas también ha sido reportado, encontrándose que 7 de los 10 genotipos de mora azul 'Lowbush' no variaron significativamente en la composición de antocianinas, pero 3 genotipos prácticamente no presentaron antocianinas aciladas, sugiriendo que la síntesis de transferasa involucrados en la unión de grupos acilo está también bajo el control genético.



La distribución porcentual de antocianinas varían entre especies comercialmente importantes de mora azul, con cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina y petunidina constituyendo 31%, 43%, 5%, 7% y 14% de las antocianinas totales en la mora azul 'arándano Bilberry', 14%, 38%, 24%, 7% y 16% en la mora azul 'Lowbush' y 6%, 41%, 32%, 1% y 19% en mora azul 'Highbush', respectivamente. Las antocianinas en la mora azul están presentes predominantemente en la piel, a excepción del arándano Bilberry, en el cual residen tanto en la piel como en la pulpa (Edid, 2011).

- **Zarzamora:**



(1). Cianidina-3-glucósido del extracto en MetOH y (2). Cianidina-3-glucósido del extracto en EtOH

Zarzamora	Tiempo de retención (Tr) en minutos	mg de cianidina/g de muestra fresca	Desviación estándar
MetOH	6.4195	0.0480	±0.0115
EtOH	6.7155	0.0047	±0.004

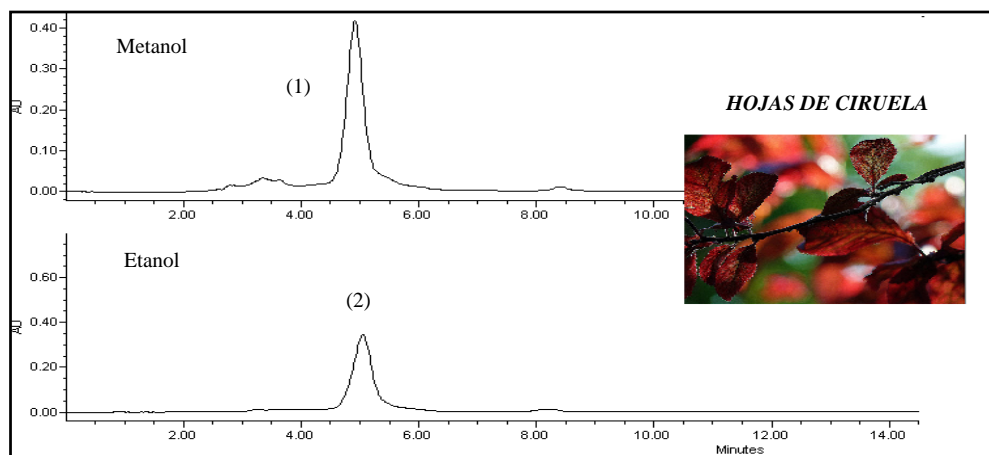
Figura 4.16. Cromatograma N°6: Concentración de cianidina-3-glucósido en Zarzamora (*Rubus ulmifolius*).

De manera general se tiene que cuando la Zarzamora se extrajo con disolventes, el valor más representativo de la cantidad total de antocianinas se obtuvo mediante la extracción con metanol (1.0915 mg/g) y mediante las resinas hidrofóbicas (16.3177 mg/g). Finalmente con la cuantificación por HPLC, se tuvo que del total de antocianinas, 0.0480 mg/g de muestra fresca en metanol correspondieron específicamente para la cianidina 3-glucósido como valor máximo dando la señal en un tiempo de retención de 6.41 minutos. Los derivados de cianidina predominan en las zarzamoras con varias entidades de azúcar (glucosa, arabinosa, rutinosa y xilosa) unidas a C3.

Las antocianinas están presentes, predominantemente en forma no acilada (94%) y existen principalmente como monoglicósidos (90%) con el resto como diglicósidos.

Tres derivados acilados (cianidina-3-(3-malonil)-glucósido, cianidina-3-(6-malonil)-glucósido y cianidina-3—dioxaloilglucósido) así como el 3-glucósido de pelargonidina también han sido identificados en el fruto. La cianidina-3-dioxaloilglucósido, un nuevo zwitterion identificado por primera vez en *Rubus laciniatus*, parece ser una antocianina única en el fruto de la zarzamora. Varios estudios han reportado la distribución de antocianinas en los genotipos de zarzamora. La distribución de antocianinas en 51 muestras de zarzamora fue del 44% al 95% para cianidina-3-glucósido, de trazas al 53% para cianidina-3-rutinosido, de no detectable a 11% para cianidina-3-xilósido, de traza al 5% para cianidina-3-(malonil)-glucósido y de no detectable al 15% para cianidina-3-dioxaloilglucósido. En otro estudio, la distribución de antocianinas en 5 genotipos de zarzamora fue del 75% al 84% para cianidina-3-glucósido, de 1% a 12% para cianidina-3-rutinósido, del 4% al 8% para cianidina-3-xilósido, del 2% al 3% para cianidina-3-(malonil)-glucósido y del 3% al 8% para cianidina-3-dioxaloilglucósido. El efecto de la genética en la composición de antocianinas ha sido observado en un estudio adicional, encontrándose que un cultivar silvestre contenía un pico mayor de cianidina-3-rutinósido, pero un pico menor de cianidina-3-glucósido que el cultivar Comanche. También encontraron que las bayas Marion y Evergreen tuvieron picos menores de glicósidos de cianidina, pero contenían un pico identificado como malvidina-3-glucósido que no estaba presente en los cultivares silvestre y Comanche (Edid, 2011).

• **Hojas de ciruelo:**



(1). Cianidina-3-glucósido del extracto en MetOH y (2). Cianidina-3-glucósido del extracto en EtOH

Hojas de Ciruela	Tiempo de retención (Tr) en minutos	mg de cianidina/g de muestra seca	Desviación estándar
MetOH	5.0501	389.5309	±0.9309
EtOH	4.9145	352.6089	±0.8998

Figura 5.17. Cromatograma N°7: Concentración de cianidina-3-glucósido en Hojas de ciruela (*Prunus cerasifera*).

En el caso de las Hojas de Ciruelo, el valor más representativo de la cantidad total de antocianinas se obtuvo mediante la extracción con etanol (141.8122 mg/g) y mediante las resinas hidrofóbicas (106.9033 mg/g) con metanol. Finalmente con la cuantificación por HPLC, se tuvo que del total de antocianinas, 389.5309 mg/g de hoja seca en un extracto en metanol correspondieron específicamente para la cianidina 3-glucósido como valor máximo dando la señal en un tiempo de retención de 5.05 minutos.

Por tanto la combinación de técnicas cromatográficas como CCF complementadas con extracciones químicas, detección mediante Espectrofotometría y HPLC con detección permiten la determinación de cianidna-3-glucósido en los extractos de las fuentes vegetales empleadas; ciruela, frambuesa, mora azul, zarzamora y hojas de ciruelo.

## **CONCLUSIONES**

Se identificó que en el maíz morado, en frutos de ciruela, frambuesa, mora azul, zarzamora y otras fuentes vegetales como en las hojas de ciruelo, se encuentra cianidina-3-glucósido. Su presencia en las fuentes vegetales estudiadas se identificó de forma cualitativa utilizando sistemas de Cromatografía en Capa Fina (CCF) reportados en la literatura y desarrollados en el laboratorio donde el sistema BAW (Butanol/Ácido acético/H<sub>2</sub>O 4:1:5 v/v) fue el más contundente ya que permitió la identificación de posibles antocianinas por la coloración presentada en tonos que variaron desde rosas tenues hasta morados intensos

Tanto para el pericarpio y el olote del maíz morado, las mejores condiciones para la extracción de antocianinas con disolventes orgánicos fue usando metanol ácido (19:1) con un promedio de 0.8794 mg/g de muestra seca, por 24 hrs. en agitación constante y a temperatura ambiente y con una posterior repurificación con amberlita como resina partiendo de una primera extracción con etanol un valor promedio de 40.3914 mg/g de muestra seca.

Dentro de las extracciones con soluciones ácidas orgánicas, la mejor para el caso del pericarpio fue empleando una solución de ácido láctico al 10% obteniéndose 5.37 mg/g de muestra seca de antocianinas totales y con la solución ácido acético glacial al 10% para el olote del maíz morado un 5.54 mg/g de muestra, ambos por 24 hrs. en agitación constante y a temperatura ambiente de esta forma se optimizó el método a escala preparativa para los frutos de ciruela, frambuesa, mora azul, zarzamora y las hojas de ciruelo.

Dentro de la primera serie de extracciones con disolventes ácidos orgánicos se tuvo que la mejor muestra que se extrajo con metanol acidificado fue la zarzamora obteniéndose así la cantidad de antocianinas totales de 1.095 mg/g de muestra húmeda mientras que con etanol ácido fue para el extracto de mora azul con 1.0022 mg/g de muestra húmeda. En el caso de las hojas de ciruelo se tuvo un valor de 4.3275 mg/g de muestra seca partiendo de un extracto en etanol ácido.

Una vez realizado el proceso de repurificación con amberlita se tuvieron 19.7622 mg/g de muestra húmeda en el extracto de frambuesa en metanol y 20.9418 mg/g de muestra húmeda en el extracto en etanol también en la frambuesa.

Para las hojas de ciruelo la cantidad que se obtuvo fue de 106 mg/g de muestra seca tras haber sido extraído primeramente con metanol ácido.

Para el caso del análisis con la Cromatografía de Líquidos de alta resolución se tiene que las muestras donde existe una mayor concentración de cianidina-3-glucósido fue en el extracto de las hojas de ciruelo con 395.4807 mg/g de muestra seca partiendo de un extracto en etanol con un  $93 \pm 3.12$  de pureza, sin embargo el extracto de zarzamora en metanol también resultó ser un extracto potencial en el contenido de cianidina-3-glucósido lo más limpio posible con 0,0480 mg/g de muestra húmeda.

Finalmente con los resultados obtenidos se tiene que la extracción con métodos convencionales se obtienen extractos enriquecidos en antocianinas pero que tras un proceso de repurificación con método no convencionales como lo es el empleo de resinas, mejora hasta en un 30% la cantidad de antocianinas en los extractos lo cual brinda una alternativa para la obtención de diferentes colorantes naturales a partir de fuentes vegetales como lo son por ejemplo: frutos, cereales y hortalizas.

**ANEXOS**

**ANEXO I:**

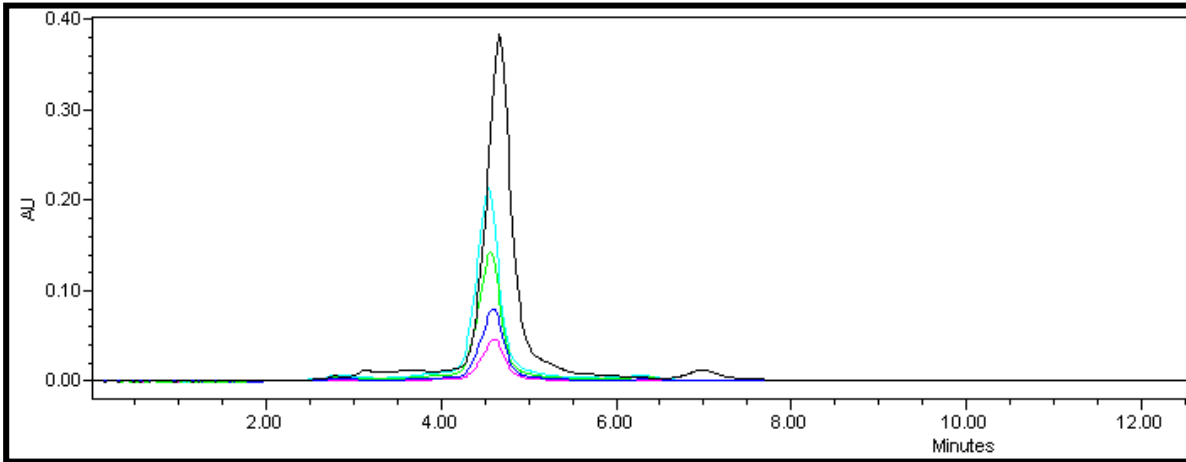
**Curvas Patrón**

Extracto CR2 de Hojas de Ciruelo (g/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio	D.S.	C.V.
0	0	0	0	0		
<b>0.0186</b>	899302	762514	786558	816125	73029.9943	8.95
<b>0.0372</b>	1601180	1515147	1430453	1515593	85364.3751	5.63
<b>0.075702</b>	2887451	2887891	2453978	2743107	250392.867	9.13
<b>0.11346</b>	4658658	4982335	4641222	4760738	192106.261	4.04
<b>0.189255</b>	8647846	8200056	8143960	8330621	276153.262	3.31
<b>0.372</b>	30031256				<b>Promedio</b>	6.21

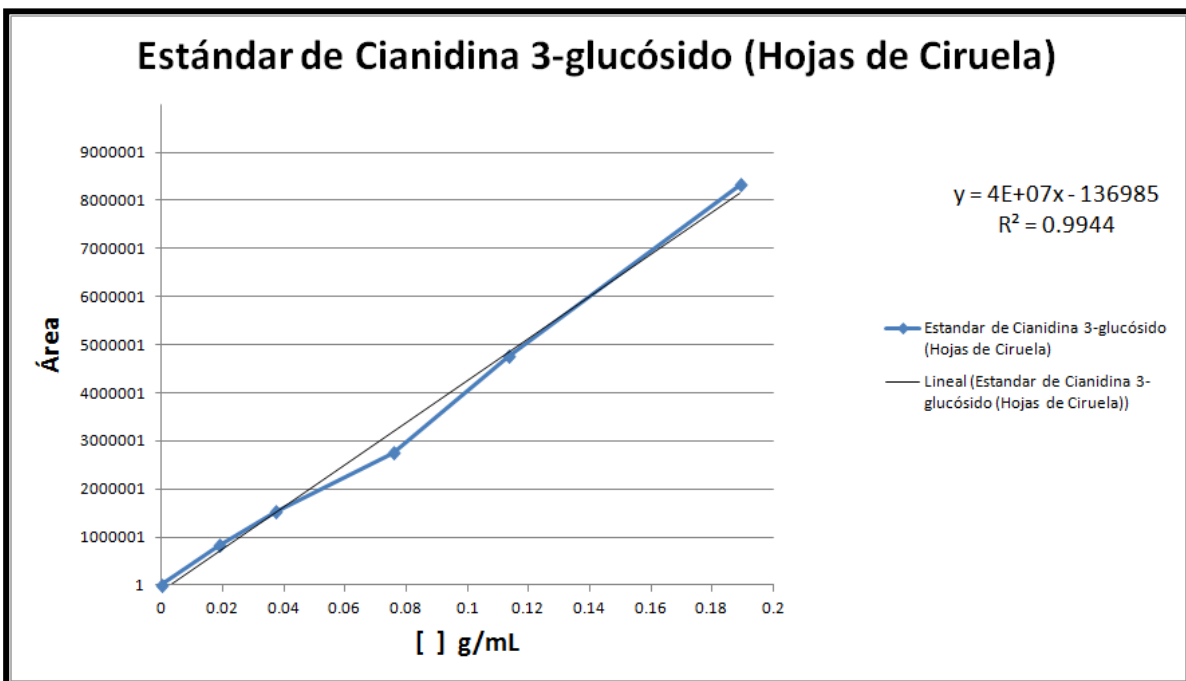
Tiempo de retención	4.5-4.9
Columna	ODS Hypersil 250 x 4,6, 5 um
$\lambda$	520 nm.
Fase A	Acido acético/Agua (10:90)
Fase B	Metanol/Agua/Acido acético (50:40:10)
Limite de Cuantificación (LC)	0.0036 g/mL
Limite de Detección (LD)	0.00004 g/mL

Tiempo	Flujo	%A	%B
	1	40	60
<b>15</b>	1.2	0	100
<b>18</b>	1	0	100
<b>23</b>	1	40	60

- Cromatograma de la Curva Patrón del Extracto con resina de las Hojas de Ciruelo:



Cromatograma de la curva patrón del extracto con resina de las Hojas de Ciruela



Curva Patrón del Extracto con resina de las Hojas de Ciruelo

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- A.O.A.C (1990). Official Methods of Analysis of AOAC International. 15<sup>th</sup> Edition, Estados Unidos. 1058-1059.
- Abdel-Aal E. y Hucl P (2003). Composition and Stability of Anthocyanins in Blue-Grained Wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 2174-2180.
- Andersen M. y Jordheim, M. (2006). The Anthocyanins. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. Boca Raton, Fl. : Andersen, KR Markham. CRC Press.
- Asen S., Stewart R. N. y Norris K. H. (1972). Co-pigmentation of Anthocyanins in Plant tissues and its Effect on Color. *Phytochemistry*. 11: 1139-1144.
- Awika M. (2004). Anthocyanins from Black sorghum and their Antioxidant properties. *Food Chemistry*. 90: 293-30.
- Azcón-Bieto J., y Talon, M. (2000). Fundamentos de Fisiología vegetal. Mc Graw Hill (Barcelona).
- Badui S. (1999). Química de los Alimentos. Longman de Mexico Editores (México) pág. 648.
- Baraud J., Genevois, L., Panart, J. (1974). Anthocyanins of Corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 11: 55-59.
- Blake G J. y Ridker P. M. (2003). C-reative Proteina and other Inflammatory risk markers in Acute Coronary syndromes. *Journal of the American College of Cardiology*. 4(4): 37S-42S.
- Boulton R. (2001). The Copigmentation of Anthocyanins and its role in the Colour of Red wine: A Critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 52: 67-85.
- Britton G. (1999). Pigments in Foods. More than just Colours. Proc. 1° Int. Cong. Pigments in Foods, Sevilla (España).
- Buldini P. L., Ricci, L., y Sharma, J. L. (2002). Review: Recent Applications of Sample Preparation Techniques in Food Analysis. *Journal of Chromatography*. 975: 47-70.
- Cabrita L. y Andersen O. M. (2000). Anthocyanin Tricacharides in Blueberries of *Vaccinium odifolium*. *Food Chemistry*. 69: 33-36.
- Caltagirone S. (2000). Flavonoids Apigenin and Quercetin inhibit Melanoma growth and Metastatic potential. *International Journal at Cancer*. 87(4): 595-600.
- Camire E. M., Chaovanalikit, A., Dougherty, P. M. and Briggs, J. (2002). Blueberry and Grape Anthocyanins as Breakfast Cereal Colorants. *Journal of Food Science*. 67(1): 438-441.
- Carretero AME (2000). Compuestos Fenólicos: Sikimatos (II). *Panorama actual del medicamento* 24. 233: 432-435.
- Castañeda-Ovando A., Pacheco-Hernandez, Ma. de L., Paez-Hernandez, Ma. E., Rodriguez, J. A., y Galan-Vidal, A. (2009). Chemical Studies of Anthocyanins: a Review. *Food Chemistry*. 113: 859-871.



- Chandra A., Rana, J., y Li, Y. **(2001)**. Separation, Identification, Quantification and Method validation on Antjocyanins in Botanical supplement raw material by HPLC and HPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 3515-3521.
- Chen J. J., Ye Z. Q. y Koo M. W. **(2004)**. Growth inhibition and Cell cycle arrest Effects of Epigallocatequina gallato in the NTB-II bladder Tumour celll line. *British Journal of Urology International*. 93(7): 1082-1086.
- Choung C. **(2004)**. Anthocyanins profiles of Korean kidneys beans (*Phaseolus vulgaris L.*). *Journal Agriculture of Food Chemistry*. 24: 740-743.
- CJ. Boluda B. Duque y Z. Aragon. **(2005)**. Lignanós (I): Estructura y Función en las plantas. *Revista de Fitoterapia* 5. 1: 55-68.
- Clifford M. N. **(2000)**. Anthocyanins-nature, Occurrence and Dietary brudem. *Journal Science of Agricultural and Journal Natural Products*. 63: 1035-1042.
- Cooke D. **(2005)**. Anthocyanins from Fruits and Vegetables- Does Bright Colour signal Cancer Chemopreventive activity. *European Journal of Cancer*. 41: 1931-1940.
- Cuevas-Rodriguez E. O. **(2010)**. Inhibition of Proinflamatory Responses and Antioxidant capacity of Mexican Blackberry (*Rubus spp.*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(17): 9542-9548..
- Dai J, Patel J. D. y Mumper R. J. **(2007)**. Characterization of Blackberry extract and its Antiproliferative and Anti-inflammatory properties. *Journal of Medicinal Food*. 10(2) 258-265.
- Dao L.et al **(1998)**. Improved Method for Stabilization of Anthocyanidins. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 46: 3564-3569.
- Daravingas G. y Cain R. F. **(1968)**. Thermanl Degradation of Black Raspberry Anthocyanin Pigments in Model Systems. *Journal of Food Science*. 33: 138.
- De Brito E. S. **(2007)**. Anthocyanins present in selected Tropical Fruits: acerola, jambolao, jussara, and guajiru. *Food Chemistry*. 55: 9389-9394.
- Deighton N., Brennan, R. y Davies, H. **(2000)**. Antioxidant Properties of Domesticated and Wild Rubus species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 1307-1313.
- Delgado-Vargas F. y O. Jimenez R. y Paredes-Lopez. **(2000)**. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins and Betalains-Characteristics, Precessing and Stability. *Critical Reviews and Nutrition*. págs. 40: 173-289.
- Delgado-Vargas, F. y Paredes-Lopez, O. **(2003)**. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins and Betalains-Characteristics, Processing and Stability. *Critical Reviews and Nutrition*. págs. 40: 173-289.
- Delpech R. **(2000)**. The importance of Red Pigments to Plant Life: Experiments with Anthocyanins. *Journal of Biological Education*. 34(4): 206-210.
- Dendy D. A. V. y Dobraszczyk Bordan J. **(2001)**. Cereales y Productos derivados. *Quimica y Tecnología*. Editorial Acribia, Zaragoza (España).

- Dzedzic S y Hudson B. **(1983)**. Hydroxy Isoflavones as Antioxidants for Edible oils. *Food Chemistry*. 11: 161-166.
- Eder R. **(1996)**. Pigments: anthocyanins. Handbook of Analysis. Editorial Nollet L. M.: Marcel Dekker, Inc. (Nueva York) I: 970.
- Elbe von J. H. Schwartz J. Steven. **(2000)**. Colorantes. Química de los Alimentos. Fennema Owen R. Zaragoza (España).
- Escribano-Bailon M. T., Santos Buelga C. y Rivas-Gonzalo J.C. **(2004)**. Anthocyanins in Cereals. *Journal of Chromatography A*. 1054: 129-141.
- Espinosa-Garcia B.M. **(2003)**. Antocianinas en maíces de grano pigmentado (*Zea mays* L.) y medición de su actividad antioxidante. Universidad Autónoma Chapingo. Tesis profesional (México). págs. 23, 33 y 39.
- Expertos de FAO/OIEA/OMS Informe Comité Mixto. **(1981)**. Comestibilidad de los Alimentos irradiados. OMS: *Serie de informes técnicos*. (Ginebra) N° 659.
- F.A.O. **(2006)**. Producción mundial del maíz.
- Fennema O. **(1993)**. Química de los Alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza (España).
- Fossen Torgils Rune Sliestad, Oyvind M Andersen. **(2001)**. Anthocyanins from Maize (*Zea mays*) and Reed Canarygrass (*Phalaris arundinacea*). *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 49: 2318-2321.
- Fotsis T. **(1997)**. Flavonoids, Dietary-derived Inhibitors of Cell proliferation and in Vitro angiogenesis. *Cancer Research*. 57: 2916-2921.
- Francis J. F. **(2000)**. Phenolic compounds. *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology*. 376, 1872.
- Frei B. y Higdon J. V. **(2003)**. Antioxidant Activity of Tea Polyphenols in vivo: Evidence from Animal Studies. *Journal of Nutrition*. 133(10): 3275S-3284S.
- Froehlicher Thomas Hennebelle Thierry, Martin-Nizard Françoise, Cleenewerck Patricia, Hilbert Jean-Louis, Trotin Francis, Sébastien. **(2009)**. Phenolics profiles and Antioxidative Effects of Hawthorn cell Suspensions, Fresh fruits, and Medicinal dried parts. *Food Chemistry*. 115: 897-903.
- Freedman J. E. **(2001)**. Select Flavonoids and whole Juice from Purple grapes inhibit Platelet function and Enhance nitric oxide release. *Circulation*. 103(23): 2792-2798.
- Fukumoto L. y Mazza G. **(2000)**. Assessing antioxidant and Prooxidant activities of Phenolic compounds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 48: 3597-3604.
- García A. **(2005)**. Evaluación in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis doctoral Europea. Universidad de Murcia, (España).
- Garzón G. **(2008)**. Anthocyanins as natural colorants and bioactive compounds. *Acta Biologica Colombiana*. 13: 27-36.

- Gasiorowski K., Szyba, K., Brokos, B., Koczyska, B., Jankowiak-Wodarczyk and Oszmiaski, M. **(1997)**. Antimutagenic Activity of Anthocyanins Isolated from Aronia melanocarpa Fruits. En: Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays* L.) Color Extract (P. Jing and M. M. Giusti, eds.). *Journal of Food Science*. 72(7): 363-368.
- Giusti M. M. y Wrolstad R. E. **(2001)**. Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*,(New York).
- Gorriti Gutierrez A. **(2009)**. Antocianinas, fenoles totales y actividad Antioxidante de las Corontas del maíz morado (*Zea mays* L.): Método de extracción. *BLACPMA ISSN*. 8(6): 509-518.
- Gould K., Davies K. y Winefield C. **(2009)**. Anthocyanins Biosynthesis, Functions, and Applications. Springer (New Zealand). págs. 85-87.
- Guerrero Legarreta Isabel, Lopez Hernandez, Eloisa y Armenta Lopez, Roberto E. **(2006)**. Pigmentos Sinteticos y Naturales. *Química de los Alimentos*. /Salvador Badui Dergal. Pearson Educación. (México).
- Gupta S., Afaq F. y Mukgtar H. **(2001)**. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 287(4): 914-920.
- Halbwirth H., Martens, S., Wienand, U., Forkmann, G., Stich, K. **(2003)**. Biochemical formation of anthocyanins in silk tissue of *Zea mays*. *Plant Science*. 164: 489-495.
- Harborne J. B. **(1986)**. Flavonoids: Advances in Research since 1986. *Wiley Enciclopedia of Food Science and Technology*/Editorial. John Wiley and Sons Inc. pág. 1872.
- Harborne J. y Williams C. **(2001)**. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Products Reports*. 310-333.
- Harborne, B. J., Williams, A. C. **(1988)**. Flavone and Flavonol Glycosides. *Wiley Enciclopedia of Food Science and Technology*/Editorial. Sons. John Wiley. pág. 1872.
- Hardenburg R.E., Watada, A.E. and Wang, C.Y. **(1986)**. The Commercial Storage of Fruits, Vegetables and Florist and Nursery Stocks. *Agriculture Handbook*. 66 130.
- He J., Giusti, M. M. **(2009)**. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-promoting properties. *Annual Review Food Science and Technology*. 1: 163-187.
- Hendry G. A. F. **(1992)**. Natural Food Colorants. Anthocyanins and Betalains/aut. libro Jackman R. L. y Smith J. L.
- Hosoney R. C. **(1991)**. Principios de Ciencia y Tecnología de los Cereales. Editorial, Acribia, S. A., Zaragoza (España). págs. 11, 16-18.
- Hoshino T. **(1991)**. An Approximate Estimate of Self-association Constants and the Self-stacking Conformation of Malvin quinoidal bases Studied by HNMR. *Phytochemistry*. 30: 2049-2055.
- Hrazdina G. **(1982)**. The Flavonoids. N.Y. : Harborne, J.B.; mABRY, T.J., Editorial Chapman and Hall.
- Hulme A.C. **(1970)**. The Biochemistry of Fruits and their Products. AVI. 1.

- IOWA State University. **(2002)**. Como se desarrolla una planta de Maíz. pág. 21.
- Jackman L. R. y Smith L. J. **(1992)**. Anthocyanins and Betalains. Natural Food Colorants/aut. libro Hendry G. A. y Houghton J. D. Blackie and Son Ltd., Glasgow.
- Kahkonen M. P. **(2003)**. Berry Anthocyanins: Isolation, Identification and Antioxidant activities. *Journal of Science of Food Agricultural*. 83: 1403-1411.
- Kalt W. **(1999)**. Antioxidant Capacity, Vitamin C, Phenolics, and Anthocyanins after fresh Storage of Small Fruits. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 47: 4638-44.
- Keevil J. G. **(2000)**. Grape Juice, but not Orange juice or Grapefruit juice, Inhibits human platelet Aggregation. *Journal Of Nutrition*. 130(1): 53-56.
- Koide T., Hashimoto, Y., Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M. and Terabe, K. **(1997)**. Antitumor Effect of Anthocyanins Fractions Extracted from Red Soybeans and Red Beans in vitro and in vivo. En Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays L.*) Color Extract. *Journal of Food Science*. 72(7): 363-368.
- Kong J. M. **(2003)**. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 64: 923-933.
- Kong J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F. Y Brouillard, R. **(2003)**. Analysis and Biological Activities of Anthocyanins. *Phytochemistry*.
- Kuo S. M., Leavitt P. S. y Lin C. P. **(1997)**. Dietary flavonoids interact with trace metals and affect metallothionein level in human intestinal cells. *Biological Trace Element Research*. 62(3): 135-153.
- Kuti O. and Konuru, B. H. **(2004)**. Antioxidant Capacity and Phenolic Content in Leaf Extracts of Tree Spinach (*Snidoslolus spp.*) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 117-121.
- L. Taiz, E. Zeiger. **(2006)**. Plant Physiology. Cuarta ed., Sinauer Associates (San Diego).
- Lapidot T. **(1999)**. pH-Dependent forms of Red wine Anthocyanins as Antioxidants. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 47: 67-70.
- Lewis C. y Walker, J. **(1995)**. Effect of Polysaccharides on the Colour of Anthocyanins. *Food Chemistry*. 54: 325-319.
- Linda S. Einbond Kurt A. Reynertson, Xiao-Dong Luo, Margaret J. Basile, Edaward J. Kennelly. **(2003)**. Anthocyanin Antioxidants from Edible fruits. *Food Chemistry*. 23-28.
- Ludwig A. **(2004)**. The tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate reduces cytokine-induced VCAM1-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 316(3): 659-665..
- M. D. Luque de Castro M. Valcárcel, M. T. Tena. **(1993)**. Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. Editorial, Reveté (Barcelona).
- M. M., Giusti; R. E., Wrolstad. **(1996)**. Caracterización of Red Radish Anthocyanins. *Journal of Food Science*. 61(2):322.

- Maltos R. H. **(1998)**. Producción de maíz mejorado para pigmentos. Memorias Primer Taller de especialidades de maíz 26 y 27 de noviembre de 1998. Chapingo (México). pág. 71 a 91.
- Markakis P. **(1982)**. Stability of anthocyanins in foods. Anthocyanins as Food Colors. Academic Press Inc. Nueva York, NY (EEUU).
- Mazza G. y Brouillard R. **(1995)**. Anthocyanins in grapes and grape products. Food Science of Nutrition. 35: 341-371.
- Mazza, G., y Miniati, E. **(1993)**. Introduction. Ch. 1 in anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. Anthocyanin Pigment Composition of Red-fleshed Potatoes. *Journal of Food Science*. Rodriguez-Saona L. E., Giusti, M. M., and Wrolstad, R. E.
- Miller N. y Rice-Evans C. **(1997)**. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*. 60: 331-337.
- MJH. Isaza. **(2007)**. Taninos o Polifenoles vegetales. *Scientia et Technica* 13. 13-18.
- Molina-Rodriguez Juan F., Daquilema M. y Gomez-Bautista Cecilia. (34). **(1992)**. Participación social en la salud. Una experiencia en Simojovel, Chiapas. Salud Pública de México. 199234(6): 660-669.
- Murcia M. A., Parras P, Jimenez AM, Vera AM, Martinez-Tomé M y Ruggieri S. **(2003)**. Polifenoles y flavonoides: su importancia en la prevención de enfermedades. *Nutrición y Salud Nuevos Alimentos para Nuevas Necesidades* 3. 121-142.
- Nollet L. **(2000)**. Food analysis by HPLC. Marcel Dekker, Inc., 2000. - 2°. Edición. Nueva York (EUA). págs. 845-880.
- Palacios Fonseca Alin Jael. **(2005)**. Tesis de Licenciatura. Caracterización fisicoquímica de tres harinas instantaneas comerciales de maíz nixtamalizado, elaborados por procesos industriales. Querétaro : Universidad Autónoma de Querétaro. págs. 22-45.
- Paredes Octavio López, Guevara Fidel L. y Bello Luis Arturo P. **(2006)**. Maíz. Los Alimentos Mágicos de las Culturas Indígenas Mesoamericas. Paredes Octavio L. Fondo de Cultura Económica (México).
- Pascual-Teresa S., Santos-Buelga, C., y Rivas-Gonzalo, J. **(2000)**. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 5331-5337.
- Pascual-Teresa, S., Rivas, G. **(2002)**. Analysis of Anthocyanins from purple corn cob. [Publicación periódica] // *Journal Science of Food Agricultural*. 82: 1003-1006.
- Peterson, J. and Dwyer, J. **(1998)**. Flavonoids: Dietary occurrence and Biochemical activity. En: Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays* L.) Color Extract 8P. Jing and M. M. Giusti, eds. *Journal of Food Science*. 72(7): 363-368.
- Pierpoint S. W. **(1983)**. Reaction of Phenolic compounds with Proteins and their Relevance to the Production of leaf Protein. *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology*. Editorial. ed. J. F. Francis: John Wiley and Sons, Inc., 1983. - pág. 1872.

- Polagruto J. A., Schramm, D.D. (2003). Effects of Flavonoid-rich Beverages on Prostacyclin sintesis in Humans and Human aortic Endotelial cells: Association with ex vivo Platelet function. *Journal of Medicinal Food*. 6(4): 301-308.
- Pratt D. y Hudson B. (1990). Natural antioxidants not exploited commercially. Food antioxidants/Hudson B.. - London, U.K.:Elselvier Applied Science.
- Rein M. (2005). Copigmentation Reactions and Color stability of Berry anthocyanins, Tesis doctoral/ ed. division. Food chemistry. Department of applied chemistry and microbiology. pág. 87.
- Rice-Evans C., Miller N. y Papaganda G. (1996). Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medical*. 20: 933-956.
- Rivas-Gonzalo J. (2003). Analysis of anthocyanins. Methods in polyphenol. Santos-Buelga y G. Williamson (Eds.). págs. 338-358.
- Romero A. (2001). Casting a glance at life in Chiapas: an assay. *Sustainable Communities Review*. 4(2): 23-24.
- Salas SG. (2003). Caracterización de extractos de antocianinas obtenidas del grano de maiz (*Zea mays* L.). Tesis de Licenciatura. Chapingo, México. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Salinas M., Martinez, B., Soto, H. H., Paczka, O., Arellano, V. (2003). Efecto de la Nixtamalización sobre las antocianinas del grano de maices pigmentados. *Agrociencia*. 37: 617-628.
- Salinas Moreno Y., Rubio Hernandez D. y Diaz Velazquez A. (2005). Extracción y uso de pigmentos del grano de maíz (*Zea mays* L.) como colorantes en yogur. ALAN ISSN 0004-0622. 55: 293-298.
- Salisbury F. & C. Ross. (1994). Fisiología Vegetal. Grupo editorial Iberoamericana (México). pág. 759.
- Sato M. (2001). Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia-reperfusion-induced activation of JNK-1 and c-JUN. *Free Radical Biology and Medicine*. 31: 729-737.
- Scalver A. Manach C. and Morand C. (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*. -45: 287-306.
- Schewartz M. (2003). Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. *Biochemical Engineering Journal*. 14: 179-189.
- Shahidi F. Naczk M. (1995). Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications. *Technomic Publishing*. 247-260.
- Siriwoham T., Wrolstad, R. E., Finn, C. E., Pereira, C. B. (2004). Influence of Cultivar, Maturity, and Sampling of Blackberry (*Rubus* L. Hybrids) Anthocyanins, Polyphenolics, and Antioxidant Porperties. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 52: 8021-8030.
- Socaciu Carmen. (2008). Food colorants: chemical and functional properties. Taylor & Francis Group, LLC. págs. 25-51, 87-101, 197-227, 429-553.
- Stocker R. y Keaney J. F. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological Reviews*. 84(4): 1381-1478.

- Strack D., Wray V. (1994). The anthocyanins. *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology*. John Wiley and Sons, Inc. pág. 1872.
- Strack D., y Wray, V. (1993). The anthocyanins. The flavonoids: Advances in research since 1986. In: J. B. Harborne (Ed.). págs. 1-22.
- Talcott S. y Lee J. (2002). Ellagic Acid Flavonoid Antioxidant content of Muscadine Wine and Juice. *Journal Agricultural of Food Chemistry*. 50: 3186-3192.
- Terao J. (2009). Dietary flavanoids as antioxidants. Food factors for Health promotion. Basel, Karger. págs. 61: 87-94.
- Timberlacke C. F. y Bridle P. (1982). Anthocyanins as Food Color. Distribution of Anthocyanins in Food Plants. N.Y.: Markakis, P.
- Tomas-Barberán F. A. y Clifford M. N. (2000). Review: Flavanones, Chalcones and Dihydrochalcones-Nature, occurrence and Dietary burden. *Journal Science of Food Agricultural*. 80: 1073-1080.
- Tosetti F. (2002). Angioprevention: Angiogenesis is a common and Key target for Cancer Chemopreventive agents. *Te FASEB Journal*. 16: 2-14.
- Valenzuela B. A. (2004). El Consumo de Té y la salud: Características y Propiedades benéficas de esta bebida milenaria. *Revista Chilena de Nutrición*. 31(2): 72-82.
- Visioli F., Borsani L y Galli C. (2000). Diet and Prevention of Coronary Heart disease: The potencial Role of Phytochemicals. *Cardiovascular Research*. 47: 419-425.
- Wachter-Rodarte Carmen. (1993). Alimentos y Bebidas fermentados Tradicionales. *Biotecnología Alimentaria*. Limusa (México). págs. 312-349.
- Wagner G.J. (1982). Cellular and subcellular localization in plant metabolism. Recent Advances in Phytochemistry (Creasy, L. L. and Hrazdina, G., eds). New York and London : Plenum, Press. págs. 16: 1-45.
- Walford J. (1980). Developments in Food Colors. London: Applied Science Publishers (Ed.).
- Wang H., Cao G. y Prior R. (1997). Oxygen Radical absorbing capacity of Anthocyanins. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 45: 304-309.
- Wei Y. Q. (1994). Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein. *Cancer Research* 54. (18): 4952-7.
- Winkel-Shirley B. (2001). Flavonoids Biosynthesis. A colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology and Biotechnology. *Plant Physiology*. 126: 485-493.
- Wong D. (1995). Química de los alimentos, Mecanismos y Teorías. Editorial, Acribia, S. A. Zaragoza (España). págs. 165-174.
- Wrolstad R. E. (2000). Anthocyanins. Natural Food Colorants. Dekker Marcel/New York: Francis & G. J. Lauro (Eds.). 11: 237-252.

- Wrolstad, R. E. (2001). Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanins. Ed. Inc. Copyright © 2001 by John Wiley and Sons. Current Protocols in Food Analytical Chemistry.
- Yong Ju. Z. y Howar L. R. (2003). Effects of Solvent and Temperature on Pressurized Liquid Extraction of Anthocyanins and Total phenolics from Dried red Grape skin. *Journal Agricultural of Food Chemistry*. (51): 5207-5213.
- Zhang Z. Q. (2001). Role of anthocyanin degradation in litchi pericarp browning. *Food Chemistry*. págs. 75, 217-221.
- Zhao C., Giusti, M. M., Malik, M., Moyer, M. P. and Magnuson, B. A. (2004). Effects of Commercial Anthocyanin-rich Extracts on Colonic Cancer and Nontumorigenic colonic Cell growth. En: Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays* L.) Color Extract. *Journal of Food Science*. 72(7): 363-368.

## REFERENCIAS ELECTRONICAS:

- BRITANIALAB en línea: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/mrsagar.htm>.
- SERNAC en línea: <http://www.sernac.cl/download.php?id=892&n=2>.
- CIMMYT en línea: <http://maizedoctor.cimmyt.org/es/component/content/8?task=view>.
- Cuevas Montilla E., Antezana A. y Winterhalter P. Analisis y Caracterización de Antocianinas en diferentes variedades de Maíz (*Zea mays*) en línea:  
[http://educon.javeriana.edu.co/lagrotech/images/elyana\\_cuevas.pdf](http://educon.javeriana.edu.co/lagrotech/images/elyana_cuevas.pdf).
- Delgado en línea: <http://eclipse.red.cinvestav.mx/publicaciones/avayper/octdic03/libros.pdf>.
- Edid, Moises. "Nutrición especializada", en línea:  
[http://nutricionpersonalizada.wordpress.com/2011/12/02/fitoquimicos\\_bayas/#top](http://nutricionpersonalizada.wordpress.com/2011/12/02/fitoquimicos_bayas/#top).
- F.A.O. en línea: <http://www.fao.org/docrep/x5055s/x5055S02.htm>.
- Martinez M. A. Quinonas y compuestos relacionados en línea:  
<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/quinonas.pdf>.
- Portalfama en línea:  
<http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/0/4DE2A203>.