



“Extracción de antocianinas de maíz criollo para su aplicación en alimentos”

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGIA

Presenta:

Jessica Itzel Muñoz Rosales

Directora:

Dra. Ivonne Pérez Xochipa

Co-director:

Dr. Ramsés Elías Ramírez Gutiérrez

Agosto 2024



CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE CUADROS	7
RESUMEN	9
I. INTRODUCCIÓN	10
II. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1. Maíz criollo	12
2.1.1 Papel del maíz criollo en México.....	12
2.1.2 Usos.....	13
2.1.3 Valor nutricional	13
2.2. Colorantes artificiales y pigmentos naturales en la industria.....	13
2.2.1 Clasificación.....	15
2.2.2 Aplicaciones en la industria	18
2.3. Antocianinas.....	19
2.3.1 Estructura	19
2.3.2 Estabilidad	21
2.3.3 Antocianinas en el maíz criollo	24
2.3.4 Beneficios nutraceuticos	25
2.3.5 Aplicación	28
2.4. Sidra.....	30
2.4.1 Proceso de elaboración	30
2.4.2 Propiedades fisicoquímicas de la sidra.....	32
2.4.3 Propiedades nutricionales de la sidra.	32
III. JUSTIFICACIÓN	34
IV. OBJETIVOS.....	35

4.1 Objetivo general.....	35
4.2 Objetivos particulares.....	35
VI. DIAGRAMA DE TRABAJO.....	36
VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
7.1 Material biológico.....	37
7.2 Material de laboratorio.....	37
7.3 Métodos.....	37
VIII. METODOLOGÍA.....	38
8.1. Preparación de la materia prima.....	38
8.2. Extracción de antocianinas.....	38
8.3. Contenido de antocianinas.....	39
8.4. Análisis de cromatogramas.....	39
8.5. Adaptación de la metodología seleccionada.....	39
8.6. Adición de las antocianinas al producto final.....	40
8.7. Análisis fisicoquímicos del producto.....	41
8.7.1 pH.....	41
8.7.2 Turbidez.....	41
8.7.3 Proteína.....	41
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
9.1 Obtención de antocianinas.....	42
9.2 Identificación de antocianinas; Análisis por HPLC-UV/vis.....	43
9.2.1 Análisis del Método de extracción 1.....	45
9.2.2 Análisis del Método de extracción 2.....	47
9.2.3 Análisis del Método de extracción 3.....	48
9.2.4 Análisis del Método de extracción 4.....	49

9.3 Comparación de antocianinas obtenidas en el estudio HPLC-UV/Vis	51
9.4 Adaptación de la metodología seleccionada.....	54
9.5 Aplicación del extracto en la sidra.....	55
9.6 Análisis fisicoquímicos.	57
9.6.1 pH	58
9.6.2 Turbidez.....	58
9.6.3 Proteínas	59
X. CONCLUSIÓN	61
XI. REFERENCIAS	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Titulo de la figura	Página
1	Estructura general de las antocianidinas.	20
2	Sacáridos más comunes en las antocianinas.	22
3	Diagrama de trabajo.	36
4	Frascos con harina de maíz azul y solución extractora luego de 24h en refrigeración	42
5	Viales con muestras liofilizadas re suspendidas en 3ml de metanol.	43
6	Cromatogramas de las muestras inyectadas en el equipo de HPLC.	44
7	Estructuras químicas de las antocianinas encontradas con el método de extracción 1.	46
8	Estructuras químicas de las antocianinas encontradas con el método de extracción 2.	48
9	Estructuras químicas de las antocianinas encontradas con el método de extracción 3.	49
10	Estructuras químicas de las antocianinas encontradas con el método de extracción 4.	50
11	Extractos filtrados obtenidos con la metodología adaptada, después de 24 horas en refrigeración.	55
12	Extracto de antocianinas a partir de maíz criollo rojo y azul luego de concentrarse durante tres días en estufa a una temperatura máxima de 60°C.	55

13	Muestra de 100ml de sidra con 20 ml de extracto de antocianinas de maíz azul.	56
14	Muestra de 130ml de sidra con 20 ml de extracto de antocianinas de maíz azul.	56
15	Muestra de 100ml de sidra con 20 ml de extracto de antocianinas de maíz rojo.	57
16	Muestra de 130ml de sidra con 20 ml de extracto de antocianinas de maíz rojo.	57
17	Tubos de ensayo con la prueba de Biuret negativa.	59

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título del cuadro	Página
1	Clasificación de los colorantes artificiales.	18
2	Sustituyentes de diferentes tipos de antocianidina según la estructura general, así como la absorbancia que presenta cada una.	20
3	Variedad de antocianinas en distintos maíces pigmentados.	26
4	Aplicaciones de las antocianinas investigadas durante los últimos años en diferentes industrias.	29
5	Límites específicos para las características presentes en la sidra según la NOM-199-SCFI-2017.	33
6	Métodos empleados en este trabajo	37
7	Tiempos de retención, T_R normalizado y diferencia de T_R normalizado, así como la amplitud de cada pico del cromatograma con la solución extractora 1 (etanol 70%).	45
8	Tiempos de retención, T_R normalizado y diferencia de T_R normalizado, de acuerdo con Fernández-Aulis, 2019.	45
9	Tiempos de retención, T_R normalizado y diferencia de T_R normalizado, de acuerdo con Min-kyoung, 2008.	46
10	Tiempos de retención, T_R normalizado y diferencia de T_R normalizado, así como la amplitud de cada pico del cromatograma con la solución extractora 2 (etanol 70% acidificado con HCl 1N).	47
11	Tiempos de retención, T_R normalizado y diferencia de T_R normalizado, de acuerdo con Dae-Woon, 2021.	47

12	Tiempos de retención, T_R normalizado y diferencia de T_R normalizado, así como la amplitud de cada pico del cromatograma con la solución extractora 3 (metanol con TFA 1%).	49
13	Tiempos de retención, T_R normalizado y diferencia de T_R normalizado, así como la amplitud de cada pico del cromatograma con la solución extractora 4 (2 propanol con SDS).	50
14	Amplitud e identificación de antocianinas método de extracción 1.	51
15	Amplitud e identificación de antocianinas método de extracción 2.	52
16	Amplitud e identificación de antocianinas método de extracción 3.	52
17	Amplitud e identificación de antocianinas método de extracción 4.	53
18	Resultados de turbidez.	58
19	Resultados de análisis fisicoquímicos.	60

RESUMEN

Existe una gran diversidad genética y fenotípica del maíz, lo que da lugar a una amplia gama de variedades de maíz criollo, que van del blanco, amarillo, rojo, azul y negro. México es uno de los principales productores y consumidores de este alimento, sin embargo, el consumo de maíces pigmentados ha ido disminuyendo con el paso del tiempo.

Estos maíces pigmentados contienen antocianinas, las cuales son antioxidantes compuestos por dos anillos aromáticos α y β unidos a una cadena de tres carbonos, estos les confieren las coloraciones a dichos maíces. Tales compuestos tienen una gran capacidad para ser usados como colorantes en distintas industrias, no obstante, tienen ciertas limitantes físicas y químicas.

En este trabajo se probaron diferentes métodos de extracción de antocianinas en harina de maíz azul, empleando distintas soluciones extractoras en muestras sometidas bajo las mismas condiciones de temperatura, luz y humedad; siendo la solución extractora compuesta por etanol 70% acidificado con ácido clorhídrico 1N, la más eficiente. Este resultado se adaptó usando etanol al 70% con ácido cítrico para obtener el extracto de antocianinas a partir de harina de maíz azul y rojo, y emplearlo en una matriz adecuada, en este caso se utilizó la sidra; finalmente se realizaron análisis fisicoquímicos (pH, turbidez, grados Brix y proteínas) a la sidra con y sin los extractos de antocianinas para realizar una comparación, dando un resultado poco favorable respecto a la turbidez y a los grados Brix.

Como resultado, tenemos que debido a las características fisicoquímicas de la sidra es ideal para mantener una buena estabilidad de las antocianinas, y pueden ser empleadas como colorantes en esta bebida. Por otro lado, el método de extracción usado es lento y conlleva más trabajo en la producción de la sidra, por lo que se recomienda mejorar el proceso para poder llevarlo a nivel industrial.

I. INTRODUCCIÓN

Los alimentos que consumimos día a día en nuestra dieta contienen diferentes componentes distribuidos de manera heterogénea y son denominados nutrientes, los cuales tienen diversas actividades biológicas (Koh, *et al.*, 2014).

El maíz contiene diversos nutrientes según las diferentes razas que existen. En México es el alimento principal de la población, brinda el 39% de la proteína asimilable y el 59% de la energía ingerida por los mexicanos (Sierra-Macias *et al.*, 2016), que consumen 100 kg de maíz per cápita al año (González-Cortés *et al.*, 2016).

Por ello, el cultivo de maíz es el más importante, cubriendo poco más de la mitad de la superficie agrícola, por lo cual tiene un gran interés político, económico y alimenticio (CONANP, 2016).

Según la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), están reconocidas 64 razas distintas de maíz que son constantemente producidas en distintas partes de la república mexicana, las cuales equivalen al 29% de todas las razas que se han descrito en toda América Latina (CONABIO, 2020).

La gran cantidad de variedades se debe a la diversidad genética y fenotípica del maíz, que se expresa con variaciones en el color del grano que van del blanco, amarillo, rojo, azul, hasta el negro (Espinosa-Trujillo *et al.*, 2009b). Algunas especies que presentan pigmentación son conocidas como maíces criollos, los cuales se producen en pequeña escala o sólo son sembrados en zonas marginadas para consumo doméstico (Hellin, *et al.*, 2013).

Los nutrientes y fitoquímicos que diferencian los maíces pigmentados son los compuestos fenólicos y antocianinas (CONABIO, 2020), se encuentran en la capa de la aleurona del endospermo y, en menor concentración en el pericarpio del grano (Sierra-Macias *et al.*, 2016).

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, compuestos por dos anillos aromáticos α y β unidos por una cadena de tres carbonos y representan el grupo de pigmentos hidrosolubles más importantes (Garzón, 2008, Arrazola *et al.*, 2014). En el maíz rojo y morado se han identificado algunas variedades de antocianidinas, en mayor parte se encuentra cianidina y peonidina y, en menor cantidad pelargonidina, malvidina (Tian Xing *et al.*, 2018).

Estos pigmentos de antocianina que son responsables del color, pueden ser la base de potenciales sustitutos de los colorantes artificiales (Sánchez, 2011) y presentan alta demanda en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica. Sin embargo, se ha demostrado que las antocianinas presentan baja estabilidad y su degradación está altamente limitada con algunos factores como la temperatura, el pH, la luz, el oxígeno, entre otros (Garzón, 2008; Zhang *et al.*, 2019).

Además de su capacidad como colorantes, actualmente se conoce que estos compuestos bioactivos pueden ser considerados como nutraceuticos (Milán Carrillo *et al.*, 2017). En diversos estudios se demuestra que tienen actividad antioxidante, la cual se encarga de neutralizar radicales libres causantes de algunas enfermedades, teniendo así efectos preventivos y terapéuticos en diversas enfermedades como cáncer, diabetes, enfermedades coronarias, poder antiinflamatorio, entre otras (Mex-Álvarez *et al.*, 2013; Arrazola *et al.*, 2014).

En México existen diversas oportunidades de desarrollo para los maíces criollos, por ello en este trabajo se busca determinar un método de extracción eficaz para aprovechar las antocianinas presentes en los granos de maíz. De esta forma utilizarlas en una matriz adecuada como la Sidra de manzana, que con su pH ácido puede ayudar a tener una mejor estabilidad y se lleve a cabo su función como colorante natural en los alimentos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Maíz criollo

2.1.1 Papel del maíz criollo en México

El maíz ha destacado en la agricultura desde las civilizaciones antiguas de Mesoamérica, las cuales dependían en mayor parte de estos cultivos. Esto ha dado lugar a un constante mejoramiento en los cultivos a lo largo del tiempo, desde el teocintle hasta los maíces actuales que son aprovechados no sólo en la alimentación sino también en otras industrias como la alimentaria, cosmética y textil (Márquez-Sánchez, 2008; Sánchez, 2011).

México es considerado como “la tierra del maíz” al ser el centro de origen y diversificación de las razas nativas, por lo que el cultivo de maíz es uno de los más importantes (Sánchez, 2011; Lazos & Chauvet, 2012). Gracias a la gran variación genética y fenotípica que hay en México, se han descrito 56 especies de maíces nativos en México, las cuales se siguen sembrando sobre todo entre las comunidades indígenas (Espinosa-Trujillo *et al.*, 2009b).

A nivel nacional, el 20% de la población económicamente activa, siembran más de 8 millones de hectáreas con maíz, produciendo cerca de 22 millones de toneladas al año (Sierra-Macias *et al.*, 2016). De acuerdo con estos datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), posiciona a México en el quinto lugar de productores de maíz a nivel global y el tercer país como importador (Hellin, *et al.*, 2013).

La producción de maíz es un factor importante en la economía y seguridad alimentaria, además de tener valores socioculturales para los mexicanos; especialmente en la población rural que conservan la diversidad de los cultivos, dando oportunidad a abrir mercados para los maíces criollos y pigmentados (González-Cortés *et al.*, 2016).

2.1.2 Usos

El maíz en México es el alimento más consumido en la dieta, se consumen cerca de 12.3 millones de toneladas al año, ya que se emplea en los alimentos de manera directa en diversas formas: elote, tlixcal, masa, tamales, esquites, bebidas fermentadas y principalmente como tortilla (González-Cortés *et al.*, 2016; Sierra-Macias *et al.*, 2016). Otra parte se manda directo a las industrias alimentarias donde elaboran y distribuyen productos procesados o es utilizado como forraje, ya que es una fuente de energía importante en la alimentación de los animales de ganadería (Sierra-Macias *et al.*, 2016).

Los maíces criollos pigmentados también tienen algunas aplicaciones en la alimentación como tortillas, totopos, antojitos, pinole, tamales, pero su uso es menor comparado con el maíz blanco o amarillo. La SEDAPA en conjunto con la FAO, han trabajado en involucrar la agricultura familiar a los mercados de comercialización buscando un valor agregado de estas variedades de maíz; dentro de ello se busca la comercialización de productos terminados y el aprovechamiento de algunos compuestos presentes en los granos (Sánchez, 2011).

2.1.3 Valor nutricional

El consumo de maíz cuenta con un alto valor nutricional, es responsable del 39 % de la proteína asimilable y el 59% de la energía que ingieren los mexicanos, con un consumo per cápita de 100 kg de maíz al año (González-Cortés *et al.*, 2016; Sierra-Macias *et al.*, 2016).

Los maíces pigmentados se caracterizan por contener alta cantidad de componentes bioactivos. En el maíz amarillo encontramos carotenoides, principalmente β -caroteno que funciona como precursor de la vitamina A; mientras que, en los maíces de color rojo, azul y negro, contienen altas concentraciones de compuestos fenólicos y antocianinas (Sánchez, 2011; Sierra-Macias *et al.*, 2016).

2.2. Colorantes artificiales y pigmentos naturales en la industria

En la industria de alimentos, los colorantes son considerados aditivos y se emplean principalmente para recuperar el color que se pierde en el alimento durante su

procesamiento, acentuar el color original o simplemente brindar colores más atractivos al consumidor (Sánchez-Juan, 2013).

Su importancia radica en que el color es el primer acercamiento que existe entre producto-consumidor, por lo que es determinante para la aceptación del producto. Además, también son aplicados en la industria de fármacos, cosméticos, textiles, entre otros, con la misma finalidad: mejorar la presentación del producto para el consumidor (Sánchez-Juan, 2013; Rodríguez *et al.*, 2019).

Un aditivo de color, según la Administración de alimentos y medicamentos (FDA por sus siglas en inglés), es “cualquier tinte, pigmento o sustancia que, cuando se agrega o aplica a un alimento, medicamento o cosmético, es capaz de impartir color” (Barrows *et al.*, 2017).

El uso de los colorantes se conoce desde la época de los aztecas en México, los mayas en América Central y otras civilizaciones como Chancay e Incas. Usaban la cochinilla (*Coccus cacti*), un insecto que se encuentra en las ramas de los cactus, como colorante en tejidos y pinturas rupestres (Juárez, 2020a).

Este pigmento, en la época colonial fue el tercer producto de mayor importancia económica, empleado principalmente en textiles como la lana británica “red coats” y algunos pintores famosos lo usaban para sus obras (Gómez-Dávalos, 2017; CINEVESTAV, 2019; Castillo, 2020).

Posteriormente, en 1856 la industria de los colorantes fue evolucionando cuando William Henry Perkin descubrió el primer tinte orgánico sintético, al que se conoció como malva. Se empezaron a realizar más investigaciones sobre colorantes sintéticos y los empezaron a aplicar en las diferentes industrias. Esto dio lugar a que se buscara una mayor regulación y estudios sobre los efectos de los colorantes sintéticos, creando organismos reguladores como la FDA (Barrows *et al.*, 2017).

A lo largo del tiempo, la FDA ha ido regulando el uso y la aceptación de los colorantes, en especial los sintéticos, ya que algunos han demostrado tener consecuencias en la salud como alergias, hiperactividad en niños y cáncer; quitándolos completamente del mercado (Barrows *et al.*, 2017; Villota *et al.*, 2019).

A partir de los diversos estudios realizados, la FDA estableció ciertos criterios que deben cumplir los colorantes para poder ser aprobados y utilizados en las industrias, en la actualidad estos criterios aún son requisitos indispensables para poder ser considerado colorante.

Para que un colorante sintético sea aceptado, debe ser inocuo, tener alto poder de coloración para poder usar cantidades mínimas, no poseer olor ni sabor que afecte al producto, ser económicamente aceptable, entre otros. Además de considerar que no sea inestable a factores como la luz y el calor, el pH, agentes oxidantes y/o reductores, y altas temperaturas (FDA, 2010).

Se deben realizar análisis exhaustivos de los colorantes siguiendo los criterios previamente mencionados. También, se debe hacer análisis en el producto donde se requiere aplicar, ya que algunos pueden reaccionar con trazas de metales y alteran el color, así como las posibles reacciones con otros compuestos del medio (FDA, 2010; Juárez, 2020a).

2.2.1 Clasificación

Los colorantes se dividen en dos grandes grupos: naturales y sintéticos/artificiales. A continuación, se describen ambos grupos.

2.2.1.1 Colorantes naturales

Los colorantes naturales son aquellos que provienen de fuentes naturales, se obtienen de vegetales, animales o minerales y no son sometidos a modificaciones químicas (Villota *et al.*, 2019; Juárez, 2020b). Estos colorantes, a su vez se dividen en hidrosolubles, liposolubles, y minerales (Sánchez-Juan, 2013).

Algunos colorantes hidrosolubles son:

Curcumina (E100): se extrae del rizoma de la cúrcuma (*Curcuma longa*), brinda tonalidades amarillo-anaranjado. Es usado principalmente en la elaboración del curry, en refrescos, mermeladas, mantequillas y quesos. Se usa también en el sector textil para teñir algodón, lana y seda. Se ha demostrado que tiene propiedades terapéuticas como antiinflamatoria, ayuda a la digestión, prevención de

cáncer, mejora la función hepática, entre otros (Núñez & Navarro, 2013; Sánchez-Juan, 2013; Watson, 2017).

Rivoflavina (E101): también se conoce como lactoflavina o vitamina B2; proporciona un color amarillo-verdoso, se obtiene a partir de la levadura de cerveza o de *Bacillus subtilis* mediante técnicas moleculares. Es usada para brindarle color a la mayonesa, sopas instantáneas, cereales, verduras en conserva, harinas enriquecidas, entre otros. Brinda alto aporte vitamínico, sin embargo, cuando se usa como colorante, no se puede hacer mención de su efecto (Barros-Santos, 2008; Núñez & Navarro, 2013; Sánchez-Juan, 2013).

Cochinilla o ácido carmínico (E120): Pigmento que se obtiene de las hembras desecadas de las cochinillas escarlata. Es un colorante muy caro por el proceso y el poco rendimiento que se obtiene. Se usa muy a menudo en licores, vinos, refrescos, confituras, etc. Además, se utiliza en la industria de cosméticos en labiales (Barros-Santos, 2008; Sánchez-Juan, 2013).

Rojo de remolacha, betanina o betaína (E162): este compuesto se encuentra de manera natural en el betabel (*Beta vulgaris*), semillas y hojas de amaranto, la tuna púrpura y las pitayas. Se emplea en yogur y otros productos lácteos, bebidas, salsas; también en productos cosméticos y textiles (Núñez & Navarro, 2013; Sánchez-Juan, 2013; Sánchez *et al.*, 2015).

Antocianinas (E163): Se encuentra en alimentos de color rojo-azul, como las fresas, maíz negro, uvas, moras, y su obtención es a partir de la extracción de estos productos. Se aplican en yogur, gelatinas, helados, dulces, y productos con pH bajo (Núñez & Navarro, 2013; Sánchez-Juan, 2013).

Caramelo (E150): se produce mediante un tratamiento térmico de carbohidratos en presencia de amoníaco o sulfitos. Se utiliza en golosinas, cerveza, bebidas alcohólicas, pan, cereales, chocolate y refresco de cola (Núñez & Navarro, 2013; Sánchez-Juan, 2013).

Dentro de los colorantes liposolubles están:

Clorofilas, clorofilinas (E140): pigmento verde natural presente en las hojas y plantas verdes, así como frutos inmaduros. Se extrae químicamente de algas, ortigas, alfalfa. Lo encontramos en chicles, dulces, licores; su uso es poco común por ser muy inestables (Barros-Santos, 2008; Núñez & Navarro, 2013; Sánchez-Juan, 2013).

Carotenoides (E160): colorante amarillo-rojo presente en el reino animal (langosta) y vegetal (tomate, zanahoria, pimiento), se puede obtener mediante ingeniería genética. Es muy común encontrarlo acompañado de ácido ascórbico para una mayor estabilidad. Es aplicado en mantequillas, margarina, queso, mayonesa y helados, entre otros (Barros-Santos, 2008; Sánchez-Juan, 2013).

Xantofilas (E161): proporciona colores amarillos y rojos. Se encuentra en la yema del huevo, pimientos, alfalfa, aceite de palma. Es usado para brindar color en algunos alimentos como salsas, condimentos, golosinas, pasteles y galletas (Mascarell & Carné, 2011; Sánchez-Juan, 2013).

Dentro de los minerales usados para colorantes encontramos el carbón vegetal, el dióxido de titanio, aluminio, oro, carbonato de calcio, óxidos e hidróxidos de hierro y la plata (Juárez, 2020b).

Ante la FDA, los pigmentos naturales son aditivos que se consideran “colorantes exentos de certificación” por provenir de fuentes naturales. La aplicación de colorantes naturales ha ido en aumento, debido a que los consumidores cada vez cuidan más lo que consumen y buscan más los alimentos naturales (Juárez, 2020b).

2.2.1.2 Colorantes artificiales

Estos tipos de colorantes proceden de sustancias químicas elaboradas en un laboratorio; son tintes solubles en agua por los grupos de ácido sulfónico que contienen, los cuales forman precipitados en un sustrato inerte. La presentación más común en el mercado es en forma de sales sódicas, líquidos y materiales pastosos (Sánchez-Juan, 2013; Villota *et al.*, 2019; Juárez, 2020a).

Es difícil tener una clasificación exacta de ellos, sin embargo, en el cuadro 1 se observa que se pueden dividir en dos grupos según su estructura química: azoicos y no azoicos.

Cuadro 1. Clasificación de los colorantes artificiales.

COLORANTES AZOICOS	
COLORANTE	REFERENCIA
Tartrazina (E 102)	(Arroyave <i>et al.</i> , 2008; Sánchez-Juan, 2013)
Amarillo anaranjado S o amarillo sol FCF (E 110)	(Sánchez-Juan, 2013; FDA, 2022)
Amaranto (E 123)	(Elmadfa <i>et al.</i> , 2011; EFSA, 2013)
Rojo cochinilla A o Rojo Ponceau 4R (E 124)	(Elmadfa <i>et al.</i> , 2011; Sánchez-Juan, 2013)
Rojo allura AC (E 129)	(Elmadfa <i>et al.</i> , 2011; Sánchez-Juan, 2013)
Negro brillante BN (E 151)	(Sánchez-Juan, 2013; Cameán & Repetto, 2016)
COLORANTES NO AZOICOS	
COLORANTE	REFERENCIA
Trifenil metánico: Azul patentado V (E 131), Azul brillante (E 133), Verde ácido brillante (E 142)	(Cameán & Repetto, 2016)
Colorantes xantenicos: Eritrosina (E 127)	(Sánchez-Juan, 2013; Cameán & Repetto, 2016)
Colorantes quinoleínicos: Amarillo de quinoleína (E 104)	(Sánchez-Juan, 2013)
Colorantes indigoides: Indigotina o carmín de índigo (E 132)	(Sánchez-Juan, 2013; Cameán & Repetto, 2016)

2.2.2 Aplicaciones en la industria

Los aditivos de color tienen un papel importante en la industria de alimentos, farmacéutica, cosmética y textil. Sin embargo, su seguridad se ha visto cuestionada por ser posibles agentes tóxicos, aunque actualmente gracias a los estudios que se han realizado, se tiene mayor conocimiento y control de ellos (Sánchez-Juan, 2013; Del Carpio *et al.*, 2009).

A pesar de eso, en los últimos años se han desarrollado tendencias a evitar los alimentos que contengan aditivos sintéticos y consumir lo natural que aporten mayores beneficios a las funciones biológicas (Arrazola *et al.*, 2013; Villota *et al.*, 2019). De este modo, los consumidores prestan mayor atención a las etiquetas y las industrias buscan sustituir los colorantes sintéticos por colorantes de origen natural, trabajando en desarrollar nuevas formas de obtención y estabilización, debido a las desventajas que tienen sobre los colorantes artificiales (Juárez, 2020b).

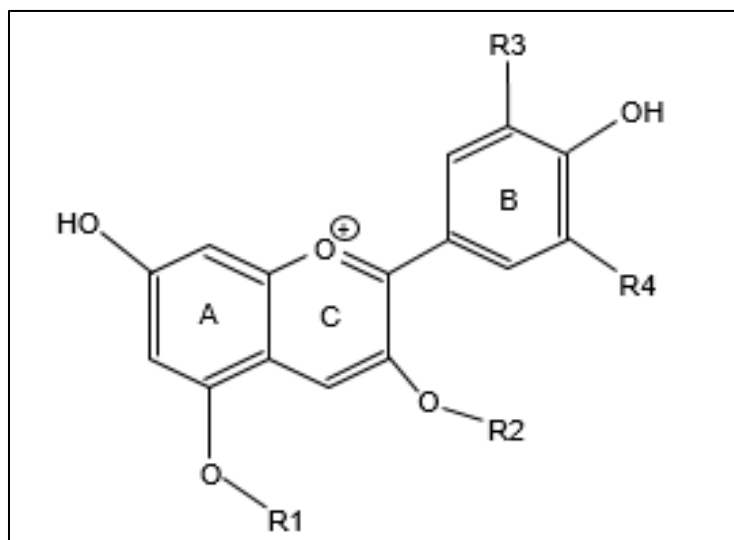
2.3. Antocianinas

Las antocianinas son metabolitos secundarios (flavonoides) que se encuentran presentes en muchos vegetales y frutos como maíces pigmentados, cerezas, ciruela, fresa, arándanos, rábanos, uvas, camote morado, entre otros. El término antocianina es derivado del vocablo griego *anthos* (flor) y *kyaneos* (azul), siendo los responsables de brindar coloraciones que van del rojo, pasando por el morado hasta coloración azul (Arrazola *et al.*, 2013; Escalante *et al.*, 2013).

Se han descrito cerca de 17 antocianidinas diferentes, sin embargo, solo 6 de ellas son más frecuentes encontrarlas en las frutas, vegetales y cereales. En los últimos años, se han hecho diversas investigaciones ya que al ser pigmentos solubles en agua e inocuos para el consumo humano, son de interés para la industria alimenticia (Salinas *et al.*, 2013).

2.3.1 Estructura

De manera general, las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, están compuestas por una molécula de antocianidina (aglicona) unida a un azúcar (glucosa, galactosa o arabinosa) mediante un enlace β -glucosídico (Rodoni *et al.*, 2017). Su estructura se basa en un ion flavilio que presenta grupos metoxilo e hidroxilo en diferentes posiciones; este ion se forma de 2 anillos aromáticos: un benzopirilo (anillo A) y un anillo fenólico (anillo B) unidos por un anillo pirano (anillo C) (figura 1) (Escalante *et al.*, 2013; Marina Zapata, 2014).



(Ríos Vasquez, 2019)

Figura 1. Estructura general de las antocianidinas.

Las distintas variaciones de antocianidinas o agliconas que dan distintos tipos de coloración son formadas por las modificaciones en su estructura química, estas modificaciones se presentan en los radicales y pueden ser hidroxilación, metilación, glicosilación y acilación (Escalante *et al.*, 2013; Salinas *et al.*, 2013). En el cuadro 2, se describen los sustituyentes a los radicales de cada uno de los tipos de antocianinas más comunes. Estas variaciones en los radicales influyen en la coloración que presentan. Como se puede observar, un incremento en grupos hidroxilo tienden a presentar tonalidades azules, mientras que un aumento en los grupos metoxilo da coloraciones rojas (Escalante *et al.*, 2013; Marina Zapata, 2014).

Cuadro 2. Sustituyentes de diferentes tipos de antocianidina según la estructura general, así como la absorbancia que presenta cada una.

Antocianina	R ₃	R ₄	λ_{max} (nm) ₃	Color
Cianidina	OH	H	506	Naranja-rojo
Peonidina	OCH ₃	H	506	Naranja-rojo
Delfinidina	OH	OH	508	Azul-rojo
Petunidina	OH	OCH ₃	508	Azul-rojo
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	510	Azul-rojo
Pelargonidina	H	H	494	Naranja

(Ríos Vasquez, 2019)

La molécula de antocianidina sufre glicosilaciones, esto les confiere gran solubilidad y estabilidad. Esta reacción sucede generalmente en la posición 3 del grupo fenólico y en las posiciones 5 y 7 (Aguilera-Otiz *et al.*,2011). En la figura 2 se muestran los sacáridos más comunes que se han encontrado en las antocianinas.

Según el número de azúcares en la estructura, se clasifican en:

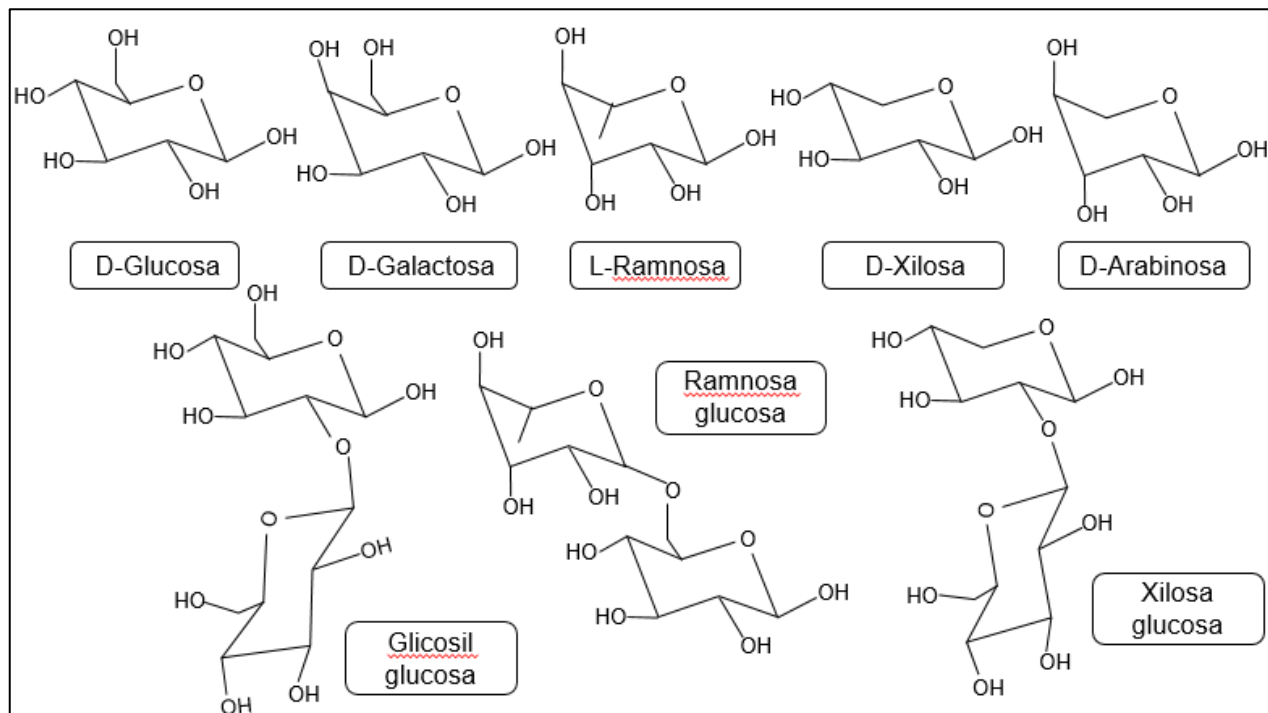
Monoglucósidos: Se adhiere solamente una molécula de azúcar. Los monosacáridos más comunes son pentosas como arabinosa y xilosa, hexosas como galactosa, ramnosa y D-glucosa, siendo la última la más frecuente en las antocianinas naturales (Aguilera-Otiz *et al.*,2011).

Diglucósidos: Constituidos por dos azúcares. Los más frecuentes son gentiobiosa, soforosa y rutinosa (Aguilera-Otiz *et al.*,2011).

Triglucósidos: formados por tres azúcares. Algunos reportados han sido lineales, como la gentotriosa, o ramificados como xilosilrutinosa y glucosilrutinosa (Aguilera-Otiz *et al.*,2011).

2.3.2 Estabilidad

La extracción de antocianinas se ve afectada por su baja estabilidad y degradación durante su procesamiento y almacenamiento. Algunos factores que influyen son el pH, temperatura, oxígeno, luz, presencia de enzimas, interacciones covalentes y no covalentes, interacciones con iones metálicos, y otros componentes presentes en el medio. Todos estos factores provocan una degradación o estabilización en el color, mostrando tonalidades amarillas o incoloras (Arrazola *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2019; Alappat & Alappat, 2020).



(Alappat & Alappat, 2020)

Figura 2. Sacáridos más comunes en las antocianinas.

2.3.2.1 pH

La estabilidad y la coloración que proporcionan los pigmentos de antocianinas dependen del pH de la solución donde se encuentren. En general, en pH ácido presentan una coloración roja, en pH neutro dan una coloración morada y conforme se va alcalinizando el medio, van cambiando a colores azules (Khoo *et al.*, 2017).

Con el cambio de pH, la estructura de las antocianinas también se va modificando. Inicialmente, las encontramos con la conformación catión de flavilio, siendo la estructura dominante en condiciones ácidas y la forma más estable, además de que esta estructura permite que la antocianina sea altamente soluble en agua (Khoo *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018).

Cuando el medio donde se encuentra tiene $\text{pH} < 3$, se encuentran en forma de sales de oxonio (AH^+) y generalmente son de color rojo intenso. Conforme va aumentando el pH sucede una pérdida del protón y adición de una molécula de agua en la posición 2, formando un equilibrio entre la pseudobases carbinol o hemiacetal y la forma chalcona, las cuales son inestables e incoloras. Por lo tanto, en pH neutro

presentan una coloración violeta y a $\text{pH} > 9$ son de color azul, sumamente inestables (Khoo *et al.*, 2017; Ríos Vasquez, 2019).

La acidez funciona como protector de las moléculas de antocianina, ya que la conformación presente en estos medios es benéfica para su estabilidad. Se puede decir que, en pH ácidos, el 100% del pigmento se encuentra estable en su forma de ion oxonio o catión flavilio (Garzón, 2008).

2.3.2.2 Temperatura

La temperatura desempeña un papel importante en la estabilidad de las antocianinas, siendo algunas veces la causante de su pérdida. En soluciones con altas temperaturas, son menos estables (Rodoni *et al.*, 2017).

En un estudio realizado por Zhang *et al.*, (2019), se analizó la estabilidad de las antocianinas en diferentes temperaturas: 4, 25 y 40°C en jugos de arándano durante su periodo de almacenamiento. Se observó que hubo una tendencia a la baja durante estas temperaturas de almacenamiento. La temperatura que tuvo mayor retención fue a los 4°C, con un 65% después de 40 días, seguido de 25°C con un 20% de retención y, finalmente la temperatura de almacenamiento a 40°C con un 27% de retención después de solo 10 días.

En otro trabajo, se sometió jugo de zarzamora y de frambuesa a condiciones de calor. Después de sólo 60 min a 90 y 100°C hubo una degradación superior al 40%; a 80°C durante 180 min hubo una pérdida del 35%; mientras que, a 70°C, luego de 180 min se perdió solamente el 23% de las antocianinas iniciales (Rodoni *et al.*, 2017).

El contenido de antocianinas en un producto y su porcentaje de retención va a depender de su temperatura de almacenamiento. A temperaturas de hasta 40°, en ocasiones la antocianina puede cambiar su coloración a naranja (Khoo *et al.*, 2017).

2.3.2.3 Copigmentación

La copigmentación intermolecular sucede en la aglicona de la antocianina, ocurre cuando los pigmentos forman complejos mediante interacciones hidrofóbicas con iones metálicos o flavonoides (Khoo *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019).

Este cambio brinda una mayor estabilidad a las antocianinas cuando son expuestas a cambios bruscos de temperatura y/o cambios de pH. Los cambios de color en las flores, se debe a la copigmentación de las antocianidinas con flavonoides, aumentando la intensidad del color de las flores (Khoo *et al.*, 2017).

2.3.2.4 Acilación

En ocasiones, el azúcar se puede unir a un radical acilo proveniente de ácidos orgánicos alifáticos, cuando esto ocurre se forman antocianinas aciladas; estos grupos acilo les confiere mayor estabilidad en cambios radicales de pH y de temperatura, así como a la exposición a la luz y al oxígeno (Salinas *et al.*, 2013; Rodoni *et al.*, 2017).

Después de ocurrir la acilación, su estabilidad en presencia de luz, calor y pH altos mejoran significativamente, así como cambios favorables en su capacidad antioxidante. Los mecanismos que suceden involucran aspectos fisicoquímicos, estereoquímicos, fotoquímicos, bioquímicos y ambientales bajo condiciones específicas (Zhao *et al.*, 2017; Teng *et al.*, 2022).

2.3.3 Antocianinas en el maíz criollo

En algunas investigaciones, han aislado e identificado las antocianinas presentes en toda la planta del maíz, en mayor abundancia y como principal compuesto han determinado la presencia de cianidina 3-glucósido, seguido de pelargonidina y otras formas glucosiladas como peonidina y malvidina (Escalante *et al.*, 2013; Salinas *et al.*, 2013).

En ambientes de clima templado-frío y alta irradiancia, las plantas de maíz acumulan antocianinas y otros flavonoides en las vacuolas de las células epidérmicas de las hojas como mecanismo de fotoprotección de los cloroplastos (Espinosa- Trujillo, 2012). En flores y hojas del maíz se ha caracterizado cianidina 3-glocósido, cianidina 3-(6''-malonilglucósido) y peonidina 3-glucósido (Escalante *et al.*, 2013). Algunos polifenoles también se han encontrado en el olote o coronta del maíz en grandes cantidades (Flores-Aguilar, 2018). Principalmente, los compuestos fenólicos están presentes en la parte externa (pericarpio y testa) y en la capa de la aleurona en el endospermo; allí encontramos cerca de 601 mg kg⁻¹ de ácidos

fenólicos donde aproximadamente el 63% de los fenoles totales son constituidos por los diferentes tipos de antocianinas. Estos compuestos encontrados en el pericarpio, en ocasiones están esterificadas a heteroxilanas y conforman la hemicelulosa de la pared celular del grano (Escalante *et al.*, 2013; Loarca-Piña *et al.*, 2019).

En los maíces pigmentados, se han encontrado diferentes tipos y concentraciones de antocianinas. El contenido total está relacionado con el color del grano, en los maíces con tonalidades azules o morados es mayor que en los maíces de color rojo (Salinas *et al.*, 2013).

Por ello, el interés en los maíces azules ha incrementado debido a las propiedades de su color, además de que son considerados nutraceuticos por la alta concentración de antocianinas que presentan y los muchos beneficios que aportan (Milán Carrillo *et al.*, 2017; Flores-Aguilar, 2018).

En el cuadro 3 se describe el contenido de antocianinas en distintos tipos de maíz, se clasifican tres niveles según la concentración: bajo, medio y alto. Los maíces blancos no se describen en la tabla ya que no presentan valores significativos de antocianinas, y se puede observar que las diferentes variedades de maíces azules son los que presentan más cantidad de antocianinas (Escalante *et al.*, 2013).

2.3.4 Beneficios nutraceuticos

Los nutraceuticos se consideran parte de un alimento que proporciona beneficios médicos y a la salud además de su contenido nutricional, utilizados para prevenir o tratar enfermedades (Santini, *et al.*, 2017; Santini & Novellino, 2017). Se obtienen de alimentos de origen vegetal y animal, con el fin de realizar alimentos complementados, añadiendo micronutrientes de interés (Santini & Novellino, 2017; Durazzo, *et al.*, 2020).

Cuadro 3. Variedad de antocianinas en distintos maíces pigmentados.

Variedad de maiz	Contenido de antocianinas ± DE (mg eq de cianidina 3 glucósido/ 100g)
BAJO	
Amarillo ceroso (Xinnuo 301)	0.63 ± 0.05
Amarillo comercial (Xinhuangdan)	1.11 ± 0.03
Rojo carmesí	5.09 ± 0.17
Rojo rubí	6.94 ± 0.19
Negro	10.07 ± 1.766
Rosa Jinheiyu	12.74 ± 0.41
Fiesta India (Multicolor)	13.17 ± 0.56
Rosa Cutie	16.39 ± 0.47
Azul Cutie	19.67 ± 0.21
Naranja	21.5 ± 1.1
Azul suave comercial	27.20 ± 0.08
Azul	29.15 ± 1.44
Negro aperlado Guangdong	29.22 ± 0.86
Azul americano comercial	30.7
Azul mexicano comercial	32.1
Azul Shaman	32.27 ± 0.15
Amarillo "Población tropical"	33.1
MEDIO	
Rojo púrpura dulce	60.71 ± 2.17
Azul criollo	62.09 ± 0.84
Azul comercial	63.1 ± 1.4
Rojo comercial	82.3 ± 3.8
RO (Rojo)	127 ± 2.13
Morado	127.7 ± 0.49
Mr-m (Rojo-morado)	141 ± 1.56
Rojo carmesí Shijazhuang	149.3 ± 5.63
M5IG04 (Rojo)	159 ± 1.22
ALTO	
Negro mexicano	324 ± 3.45
Rojo mexicano	366 ± 3.22
RaO04PV (Rojo)	385 ± 4.22
NO04c (Negro)	431 ± 34.5
Pinto mexicano (Rojo)	431 ± 3.89
337 (Morado)	478 ± 4.11
Nn04cl (Negro)	529 ± 7.12
'Veracruz 42' mexicano (Morado)	1050 ± 10.11
'AREQTL' (Morado)	2050 ± 10.15
Morado oscuro Jingheinuo	2565 ± 112.1
Morado Zhuozhou	3045 ± 163.2

(Escalante et al., 2013)

Todos los alimentos que contienen antocianinas son considerados nutracéuticos. Se sabe que las antocianinas son fitoquímicos que se caracterizan por contar con un alto poder antioxidante, del cual sobresalen sus beneficios en la salud previniendo algunas enfermedades (Jimenez *et al*, 2011).

Existen diversos estudios que han demostrado los beneficios que tienen las antocianinas, los cuales se mencionan a continuación:

Antioxidantes: Previene enfermedades causadas por las especies reactivas de oxígeno (ERO), como la leucemia y el cáncer de colon, trabajando en la protección del ADN (Rojano *et al.*, 2012).

Enfermedades coronarias y cardiovasculares: ayudan a reducir niveles de colesterol total, colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad y triglicéridos, por su efecto vaso vasoprotector (Aguilera-Ortíz *et al.*, 2009; Del Carpio *et al.*, 2009; Alvarez-Suarez *et al.*, 2014; Arencibia *et al.*, 2018).

Antiinflamatorios: se probaron el potencial antiinflamatorio de las antocianinas en pacientes con diabetes tipo 2 y se observó una reducción significativa en los biomarcadores proinflamatorios, evidenciando así su potencial (Aguilera-Ortíz *et al.*, 2009; Del Carpio *et al.*, 2009; Arrazola *et al.*, 2014; Arencibia *et al.*, 2018; Nikbakht *et al.*, 2021).

Funciones neuroprotectoras y neurodegenerativas: en un estudio hecho en ratones probaron el efecto neuroprotector contra la oclusión permanente de la arteria cerebral media, dando resultados positivos al mejorar significativamente la función neurológica bloqueando la liberación de factores de inducción de apoptosis en las mitocondrias (Min J, 2011) también se demuestran estas funciones contra el estrés oxidativo al inhibir ROS (Kim SM, 2012).

Agudeza visual: se realizó un estudio donde les dieron a pacientes con glaucoma de tensión normal un tratamiento a base de antocianinas, los resultados fueron favorables y mostraron mejoría (Shim, 2012). También, se ha demostrado que las antocianinas tienen un efecto protector sobre la función visual durante la inflamación

de la retina y ayuda a evitar la degeneración de la misma (Miyake, 2012; Paik SS, 2012).

Actividad antidiabética: las antocianinas ejercen efectos metabólicos beneficiosos en pacientes con diabetes tipo 2, al mejorar la dislipidemia, y prevenir la resistencia a la insulina (Dan *et al.*, 2015). En otro estudio, se demostró que las antocianinas mejoraron la nefropatía diabética en ratones a través de la fosforilación de AMPK, previniendo apoptosis y el estrés oxidativo en el riñón (Koh *et al.*, 2015).

Actividad anticancerígena: se ha demostrado que las antocianinas tienen propiedades anticancerígenas. Ayuda a reducir significativamente la proliferación celular en células de cáncer de mama reduciendo su viabilidad, aquí las antocianinas actúan como quimio inhibidores (Faria A, 2010; Hui *et al.*, 2014). Además, las antocianinas evitan la metástasis suprimiendo la activación de la proteína quinasa (Chen *et al.*, 2015).

Actividad antimicrobiana: las antocianinas actúan inhibiendo el crecimiento de bacterias dañando y destruyendo la pared celular, la membrana y la matriz intracelular (Pojer E, 2013).

Estos son solo algunos de los beneficios de las antocianinas que se han demostrado, por ello se ha incrementado el interés para su uso en las industrias de alimentos y bebidas, farmacéutica y cosmética.

2.3.5 Aplicación

La investigación sobre las antocianinas ha generado un gran interés en las industrias de alimentos, bebidas, farmacéuticas y cosméticas. Este interés, da lugar a buscar múltiples aplicaciones de las antocianinas, no solo como colorantes sino también para obtener alimentos nutraceuticos, biomarcadores, entre otros (cuadro 4), por lo que las investigaciones para su aplicación avanzan con mayor rapidez (Del Carpio *et al.*, 2009; Arrazola *et al.*, 2014).

Cuadro 4. Aplicaciones de las antocianinas investigadas durante los últimos años en diferentes industrias.

APLICACIÓN	FUNDAMENTO	REFERENCIA
ALIMENTOS		
Enriquecimiento de yogur con antioxidantes	Se incorpora el extracto de antocianinas en yogur natural, brindando una coloración natural y enriquecimiento con antioxidantes.	(Benchikh <i>et al.</i> , 2021)
Películas inteligentes de gelatina	Película con extractos de antocianinas para envasados, sirviendo como indicador de la vida útil respecto al pH del producto.	(Rawdkuen <i>et al.</i> , 2020), (Roy & Rhim, 2021)
BEBIDAS		
Leche con color	Se utilizó el pigmento en leche entera y leche descremada, demostrando una buena estabilidad del color.	(Jing & Giusti, 2005)
Indicador de deterioro microbiano en la leche	Activación del sensor de deterioro microbiano frente a un cambio de pH en la leche.	(Weston <i>et al.</i> , 2020)
Bebida funcional	Preparación de una bebida fermentada a base de harina de maíz y frijol, donde presenta un elevado potencial antioxidante, antihipertensivo y antidiabético.	(Milán Carrillo <i>et al.</i> , 2017; Flores-Aguilar & Flores-Rivera, 2018)
COLORANTE		
Tintes para el cabello	Se logra un teñido de color azul intenso, ya que el cabello proporciona un ambiente que permite su estabilización. El teñido fue estable a varios lavados.	(Rosa <i>et al.</i> , 2018)
Colorante natural en alimentos	Mostró una gran capacidad para la pigmentación de matrices de gelatina, yogur y mermelada.	(Gutiérrez <i>et al.</i> , 2019; Vukoja <i>et al.</i> , 2019)
Colorante en textiles	Aplicación del pigmento en tintura textil y probado en tejido de algodón, dando tonalidades rojo/violeta.	(Bechtold <i>et al.</i> , 2007)
FARMACÉUTICA		
Gel bioadhesivo con antocianinas	Se aplicaron antocianinas mediante un gel bioadhesivo para la quimiopreención bucal.	(Ugalde <i>et al.</i> , 2009)
Cianidina 3-glucósido como biomarcador	Se sugiere que la cianidina 3-glucósido es un biomarcador potencial en el plasma y orina durante la ingesta de antocianinas.	(Sandoval <i>et al.</i> , 2019)
COSMÉTICA		
Aplicación en productos cosméticos	Se agregó el extracto en un labial y en sombras para ojos, ambos productos tuvieron estabilidad en condiciones ideales de almacenamiento y buena aceptabilidad de usuarios.	(Colindres & Chinchilla, 2018)

2.4. Sidra

Según la NOM-199-SCFI-2017, define a la sidra como una bebida alcohólica resultante de la fermentación del mosto preparado a partir del jugo o concentrado de manzanas, peras o mezclas de ambas. Su grado alcohólico es ligero (3% a 8% Alc. Vol.), presenta una coloración ámbar y en su mayoría brinda sabores agridulces (Soto-Herrera *et al.*, 2008; NOM-199-SCFI-2017).

La composición del mosto puede variar respecto a su acidez según el tipo de manzanas empleadas, lo que da lugar a poder tener clasificaciones de la sidra respecto a su composición química. Según la cantidad de azúcares reductores, se puede clasificar en seca o “brut” (<30g/L), semisecca (30-50 g/L) y dulce (50-80 g/L). Además, se pueden clasificar por la cantidad de taninos y acidez presente en la sidra, en sidra amarga, ácida, dulce, dulce-amarga, ácido-amarga y acidulada (Ramírez & Álvar, 2005;García *et al.*, 2010).

La sidra natural y la sidra gasificada se categorizan en ámbar y rosada, a la cual se le adiciona mosto de uva, vino tinto, antocianinas o algún otro tipo de colorante (NOM-199-SCFI-2017).

Esta bebida es muy común en algunos países europeos como Inglaterra, Francia, Alemania, Irlanda y España, del cual pertenece la denominación de origen de sidra asturiana. En Estados Unidos, Chile y México también cuentan con una gran producción de sidra. Dentro de México, los estados con mayor producción de sidra son Puebla, Hidalgo y Chihuahua (Cousin *et al.*, 2017; SADER, 2017).

2.4.1 Proceso de elaboración

Existen diferentes variedades de manzana que se clasifican dependiendo la cantidad de polifenoles y ácido málico que contengan, de acuerdo con esto, se pueden dividir en dulces, ácidas y amargos (Merwin *et al.*, 2008).

Para que se pueda obtener un buen resultado en una sidra es importante seleccionar la variedad correcta. La mayoría de los productores, como en Europa, suelen usar mezclas balanceadas, las manzanas amargas con altos niveles de

polifenoles y taninos van a brindar la astringencia y el cuerpo característico, las manzanas ácidas ayudan a tener la acidez adecuada y mantener el pH necesario, y las dulces proporcionan la azúcar necesaria para llevar a cabo la fermentación y obtener el grado alcohólico deseado (Ramírez & Álvar, 2005; Merwin *et al.*, 2008).

Una vez que se seleccionó la materia prima, se procede a la extracción del mosto de manzana. Este proceso consta de tres etapas: molienda, maceración y prensado. La maceración se lleva a cabo con enzimas y puede llevarse a cabo de manera simultánea a la molienda o previo al prensado, esta es una etapa opcional, sin embargo, ayuda a obtener un mejor rendimiento (García *et al.*, 2010).

Para llevar a cabo el prensado, hay diversas tecnologías, las más utilizadas en la industria sidrera son las verticales de “cajón”, las prensas horizontales neumáticas y las semi-continuas automáticas de pistón. El rendimiento total de mosto obtenido va a en función de la temperatura, la presión, el tamaño de partícula, el tiempo, y de la tecnología utilizada (García *et al.*, 2010).

Posteriormente, se lleva a cabo una fermentación alcohólica por levaduras del género *Sacharomyces* sp., presentes en la flora autóctona de la manzana. Este proceso se lleva a cabo de forma espontánea cuando el mosto alcanza una temperatura mayor a 10°C; tarda de 2-3 semanas donde se obtiene etanol, otros alcoholes superiores y algunos compuestos con importancia sensorial como feniletanol y ácido acético; una vez que el grado alcohólico es constante, esta etapa concluye (Estela-Escalante *et al.*, 2014; Cousin *et al.*, 2017). Luego ocurre una fermentación maloláctica procesada por bacterias ácido-lácticas durante la maduración, la cual se lleva a cabo en barricas o tanques de acero inoxidable (Cousin *et al.*, 2017).

Otras etapas importantes en la producción de la sidra, es la adición de anhídrido sulfuroso (SO₂) el cual funciona inhibiendo el desarrollo de microorganismos, y se utiliza para la conservación de la bebida alcohólica al inhibir enzimas oxidantes. Finalmente, se lleva a cabo una clarificación que ayuda a eliminar todos los sólidos disueltos en la sidra, este se puede realizar mediante enzimas, adición de bentonita o microfiltración (García *et al.*, 2010).

2.4.2 Propiedades fisicoquímicas de la sidra

La sidra está compuesta en su mayoría por agua, ácidos orgánicos (principalmente ácido málico), azúcar, alcohol y compuestos fenólicos. Además, contiene compuestos volátiles que proporcionan el aroma característico, como alcoholes, ésteres de etilo, fenoles volátiles, compuestos carbonílicos y lactonas, entre otros (Merwin *et al.*, 2008; Antón *et al.*, 2011). Los compuestos fenólicos presentes, como procianidinas o taninos, son los responsables de proporcionar astringencia y amargor, así como el cuerpo de la sidra (Symoneaux *et al.*, 2014).

Dentro de las características enológicas más importantes encontramos el grado alcohólico que va de 3% a 8% Alc. Vol., acidez total de 3 g/L a 7 g/L de ácido málico, acidez volátil con un máximo de 1.2 g/L de ácido acético, y pH con un rango de 3.5-3.8 (cuadro 5) (Antón *et al.*, 2011).

2.4.3 Propiedades nutricionales de la sidra.

La sidra es una fuente de compuestos fenólicos y antioxidantes. Los principales polifenoles que se han encontrado en esta bebida son catequina, procianidinas, ácido hidroxicinámico, dihidrocalconas, flavonoles y en menor cantidad, antocianinas (Maslov *et al.*, 2019; Tarko *et al.*, 2020).

Estos polifenoles, al ser ingeridos se absorben por el cuerpo y se aprovechan todos sus beneficios en la salud. Se sabe que los compuestos fenólicos presentes en la manzana y en la sidra, cuentan con propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales, anticancerígenas, previenen enfermedades coronarias, e influyen de manera positiva en los niveles de lípidos en la sangre (DuPont *et al.*, 2002; Picinelli *et al.*, 2009; Weichselbaum *et al.*, 2010; Fratianni *et al.*, 2012; Havva-Budak *et al.*, 2015). Los compuestos antioxidantes presentes en la manzana se comportan con una actividad equivalente a 1500 mg de vitamina C, lo que ha demostrado que pueden inhibir la proliferación de células cancerígenas (Havva-Budak *et al.*, 2015).

Cuadro 5. Límites específicos para las características presentes en la sidra según la NOM-199-SCFI-2017.

ESPECIFICACIONES	LÍMITES	
	Mínimo	Máximo
Contenido de alcohol a (20°C) (% Alc. Vol.)	3	6
Extracto seco (g/L)	12	-
Cenizas (g/L)	1	-
Azúcares o Azúcares Reductores Totales (g/l)	-	90
Metanol (mg/100ml de alcohol anhidro)	-	300
Acidez Total (como ácido málico en g/l)	3.5	7.5
Acidez Volátil (como ácido acético en g/l)	-	1.2
Densidad Relativa a 20 °C	1.01	1.045
Bióxido de Azufre Libre (mg/l)	-	100
Bióxido de Azufre Total (mg/l)	-	300
Presión de CO2 a 293 K (20 °C) (kPa)	-	294
Volúmenes de CO2 disueltos (Vol. de CO2/vol. Del líquido)	-	5

(NOM-199-SCFI-2017)

III. JUSTIFICACIÓN

El maíz criollo en México es un patrimonio sociocultural que juega un papel importante en la ingesta de la población mexicana, siendo un factor importante en la economía y vida de muchas familias indígenas y campesinas; además de que es el principal alimento que forma parte en la ingesta alimentaria de México.

Actualmente el maíz criollo sigue siendo un producto que se siembra y se consume entre las comunidades campesinas, sin embargo, según la revista Forbes México, en los últimos años la producción de maíz criollo se ha visto amenazada por diversos factores, entre ellos que las personas buscan adaptarse a los mercados cambiantes y a las preferencias económicas, la urbanización, los cambios climáticos y los adelantos tecnológicos, lo que ha dado como resultado una disminución significativa en los cultivos de maíz criollo.

Es importante mantener los cultivos del maíz criollo pigmentado ya que además de tener un papel sociocultural importante, cuentan con componentes bioactivos como las antocianinas, que se han demostrado tienen grandes beneficios en la salud y gran potencial para ser utilizados en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética como pigmentos.

Por ello, en este trabajo se buscan métodos adecuados para extraer la mayor cantidad de antocianinas del maíz pigmentado, y aprovechar estos pigmentos que contiene para poder utilizarlos como sustitutos de colorantes artificiales en la industria alimentaria; particularmente en bebidas alcohólicas, además de complementar las propiedades antioxidantes de dicha matriz.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Extraer antocianinas a partir de maíz criollo para su aplicación en alimentos.

4.2 Objetivos particulares

1. Seleccionar la metodología de extracción de antocianinas más apropiada mediante el análisis cualitativo de cromatogramas obtenidos por HPLC.
2. Estandarizar la metodología seleccionada por HPLC para la extracción de antocianinas de maíz criollo.
3. Utilizar el extracto de antocianinas como aditivo en una bebida alcohólica fermentada.
4. Evaluar las características fisicoquímicas de la bebida alcohólica fermentada con el extracto de antocianinas.

VI. DIAGRAMA DE TRABAJO.

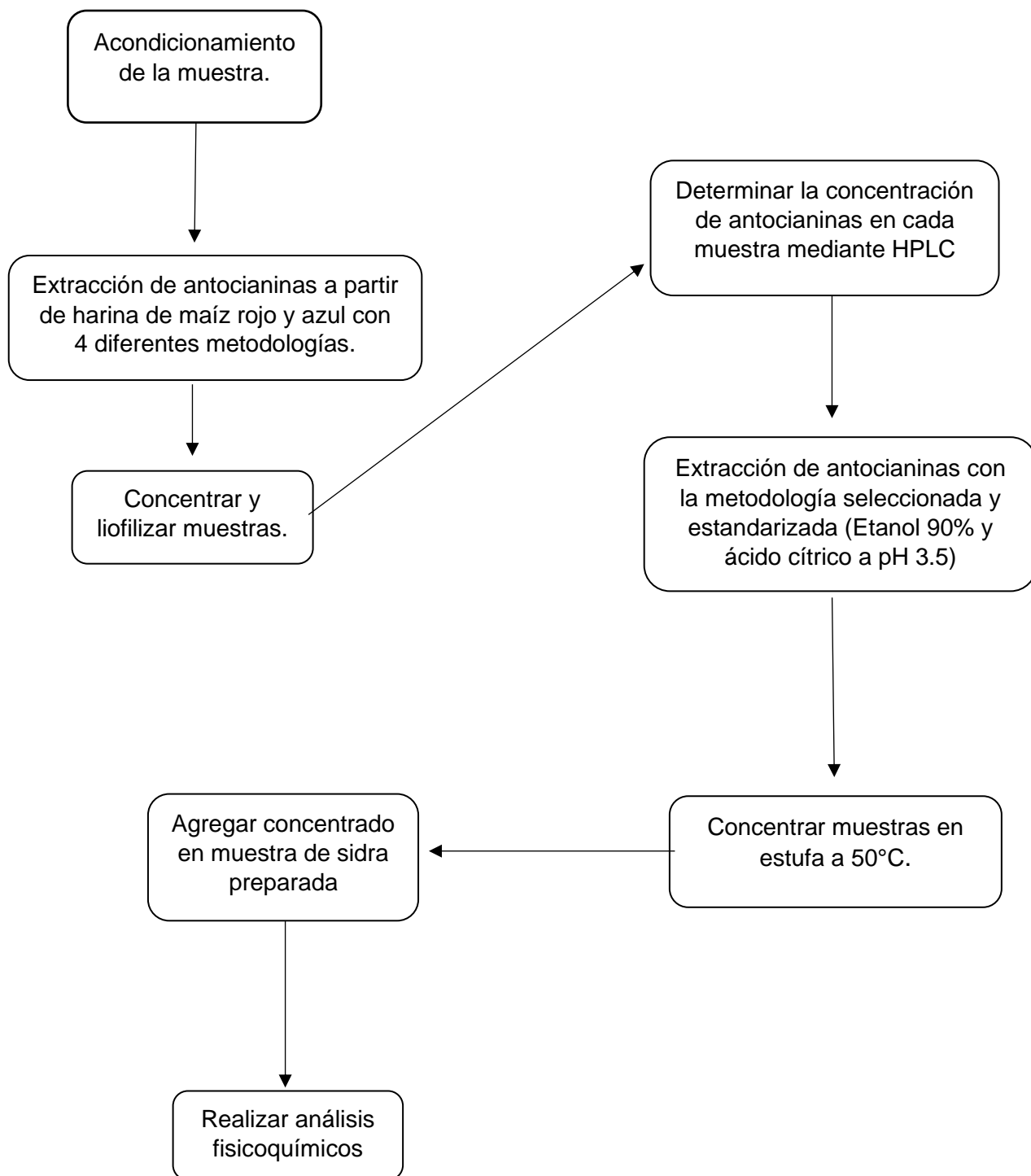


Figura 3. Diagrama de trabajo

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

Las muestras de maíz criollo con color de grano rojo (CPue558) y color de grano azul (CPue585) se obtuvieron de un lote ubicado en la región de Tehuacán, brindadas por el Grupo de Recursos Fitogenéticos Campus Puebla-Colegio de Postgraduados.

7.2 Material de laboratorio

El material de vidrio, los reactivos de grado analítico o grado alimentario y los equipos necesarios fueron proporcionados por la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y Bodegas Copa de Oro S.A. de C.V.

7.3 Métodos

En el cuadro 6, se describe cada uno de los métodos usados para realizar cada análisis.

Cuadro 6. Métodos empleados en este trabajo.

DETERMINACIÓN	MÉTODO	REFERENCIA
Extracción de antocianinas, método 1	Etanol al 70%	(Mex-Álvarez <i>et al.</i> , 2013)
Extracción de antocianinas, método 2	Ácido clorhídrico (1N) y etanol (96 °GL)	(Espinosa-Trujillo <i>et al.</i> , 2009b)
Extracción de antocianinas, método 3	Ácido Trifluoracético al 1% en metanol grado reactivo	(Espinosa-Trujillo <i>et al.</i> , 2009a).
Extracción de antocianinas, método 4	2-Propanol (2-PrOH) al 60% con SDS al 1%	(Parris y Dickey, 2001)
Determinación de antocianinas	HPLC	
Extracción de antocianinas, adaptación de metodología	Etanol 90% acidificado con ácido cítrico a pH 3.5.	(Rodríguez <i>et al.</i> , 2019)
pH	Potenciómetro	Sargent-welch
Turbidez	Turbidímetro	Hach
Proteínas	Biuret	

VIII. METODOLOGÍA

8.1. Preparación de la materia prima.

Los granos de maíz se molieron para obtener harina, se embolsaron y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

8.2. Extracción de antocianinas

Se estandarizan 4 metodologías tomadas de distintos trabajos experimentales donde se emplean diferentes solventes para la extracción de antocianinas del maíz criollo azul.

Solución extractora, método 1; de acuerdo con Mex-Álvarez *et al.* (2013): Se agregaron 25 mL de etanol acuoso al 70% durante 24 horas a temperatura ambiente, posteriormente se filtraron los homogenizados y del material sólido residual se realizó nuevamente el proceso de extracción.

Solución extractora, método 2; de acuerdo con Espinosa-Trujillo *et al.* (2009b): Se agregaron 125 ml de solución extractora (SE) compuesta con ácido clorhídrico (HCl) 1N y etanol (96 °GL), en proporción 85:15 (v/v) con pH de 1.0. Las muestras se refrigeraron por 24 h a 4 °C.

Solución extractora, método 3; de acuerdo con Espinosa-Trujillo *et al.* (2009a): La muestra de harina se secó en estufa a 60°C por 24h. Posteriormente se agregan 20 ml de solución extractora, compuesta por ácido Trifluoracético (TFA) al 1% en metanol grado reactivo. Las muestras se refrigeraron por 24h.

Solución extractora, método 4; de acuerdo con Parris y Dickey (2001): Se agregaron 50 ml de 2-Propanol (2-PrOH) al 60% con Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1%. La mezcla se agitó por 2h a temperatura ambiente. El sobrenadante se separó y se adicionaron 3 volúmenes de 2-PrOH al 100%, se dejó toda la noche a 4°C, luego se obtuvo un precipitado.

Cada frasco fue envuelto con papel aluminio para evitar contacto con la luz, y se mantuvieron en refrigeración. Finalmente, cada una de las muestras fue filtrada, posteriormente se eliminó el exceso de solvente con ayuda de rotavapor, finalmente se liofilizan las muestras concentradas. Cada extracto se realizó por duplicado.

8.3. Contenido de antocianinas

Se realiza análisis cualitativo del contenido de antocianinas de cada una de las muestras mediante un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Las muestras liofilizadas fueron re suspendidas en 3 ml de metanol y se inyectaron 20µl de cada muestra, así como un blanco para llevar a cabo el análisis. Los solventes utilizados fueron ácido fórmico+agua (solvente A) y metanol+acetonitrilo+agua+ácido fórmico (solvente B); el volumen de inyección usado fue de 0.7ml/min; se registraron las absorbancias a 530nm.

8.4. Análisis de cromatogramas.

Se determinó el tiempo de retención de cada pico y se realizó una comparación con algunos reportes bibliográficos para determinar qué tipo de antocianina se obtuvo. Al no contar con la misma técnica de elución, se realizó un método por diferencia de tiempo de relación normalizado, método que consta de comparar el tiempo de elución total con respecto al tiempo de retención de cada pico. Se usó la fórmula 1, ya que independientemente del solvente usado durante el análisis deben guardar la misma diferencia.

$$\frac{T_R \text{ del pico de interés}}{T_R \text{ último pico} - T_R \text{ primer pico}}$$

Fórmula 1

8.5. Adaptación de la metodología seleccionada.

Se utilizó un método de extracción basado en la selección de los resultados obtenidos por HPLC.

Se preparó una nueva solución extractora que consta de etanol 90% acidificado con ácido cítrico a pH 3.5.

Posteriormente se pesó una muestra de 50g de harina de maíz criollo y se agregaron en un vaso de precipitado con 400 ml de la solución extractora en agitación constante. Se dejaron reposar durante 24h en refrigeración para después filtrar las muestras y recuperar el color extraído (Rodríguez *et al.*, 2019).

Este proceso se llevó a cabo por duplicado con la harina de maíz rojo y con la harina de maíz azul. Luego, las muestras se concentraron en estufa de secado a aproximadamente 50°C hasta eliminar la mayor cantidad de etanol presente en el extracto (Rodríguez *et al.*, 2019).

8.6. Adición de las antocianinas al producto final.

Se tomó el extracto de antocianina con pipeta y se agregó en un frasco, luego se midió la sidra y se fue agregando poco a poco. Primero se agregaron 50ml de sidra al frasco con el extracto, luego otros 50ml, y finalmente 30ml más, quedando como se muestra a continuación:

Harina de maíz azul.

TIPO DE EXTRACTO	CANTIDAD DE EXTRACTO	MATRIZ EMPLEADA
Extracto concentrado	20 ml	100 ml de sidra.
Extracto concentrado	20 ml	130 ml de sidra.

Harina de maíz rojo.

TIPO DE EXTRACTO	CANTIDAD DE EXTRACTO	MATRIZ EMPLEADA
Extracto concentrado	20 ml	100 ml de sidra.
Extracto concentrado	20 ml	130 ml de sidra.

8.7. Análisis fisicoquímicos del producto.

8.7.1 pH

Se toma medición de pH con ayuda de un potenciómetro marca Sargent-welch debidamente calibrado bajo procedimiento estándar.

8.7.2 Turbidez

La medición de turbidez se realiza con un turbidímetro, se prepara la celda con la muestra de interés y se enjuaga bien con agua destilada. El turbidímetro se calibra con un blanco de turbidez 0 NTU y con otro de turbidez 4 NTU, luego se pone la celdilla preparada anteriormente con la muestra y se toma la lectura correspondiente.

8.7.3 Proteína

Se realiza un análisis cualitativo de proteínas, mediante el método de Biuret. En un tubo de ensayo se agregan 2ml de la muestra, seguido de 2ml de Sulfato de cobre y se agita; posteriormente se adicionan 4ml de Hidróxido de sodio, se agita y se deja reposar. Después de un tiempo, se debe observar una coloración violeta o rosa en la parte superior, lo que indica la presencia de proteína en la muestra.

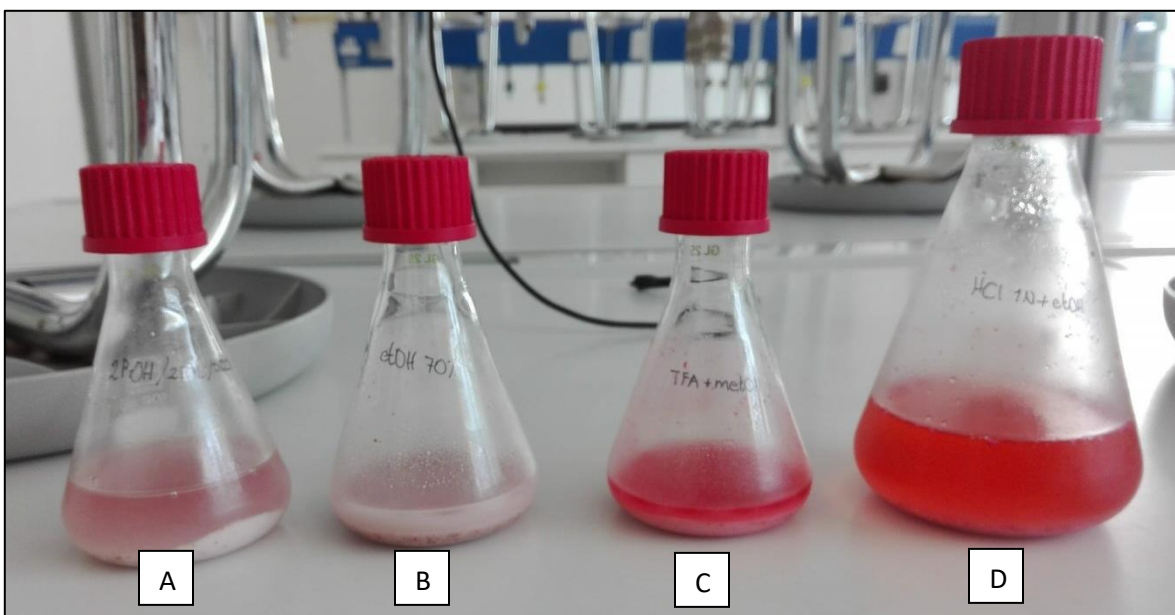
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Obtención de antocianinas

Después de llevarse a cabo las cuatro metodologías de extracción, de cada muestra se obtuvieron diferentes coloraciones, correlacionado con la eficiencia de extracción de cada proceso.

El extracto obtenido con etanol 70% presentó coloración rosa pastel, el extracto obtenido con 2-PrOH 60% y SDS 1% tuvo una coloración ligeramente más intensa parecido a un tono rosado; mientras que el extracto de TFA 1% en metanol grado reactivo mostró color fresa y el extracto obtenido con etanol 96°GL con HCL 1N presentó un tono similar al rojo carmesí.

En la figura 4 se pueden apreciar las distintas coloraciones que se presentan con cada una de las metodologías después de 24h en refrigeración.



(A) 2-PrOH 60% con SDS 1%. (B) Etanol al 70%. (C) TFA 1% en metanol grado reactivo. (D) Etanol 96°GL con HCl 1N.

Figura 4. Frascos con harina de maíz azul y solución extractora luego de 24h en refrigeración.

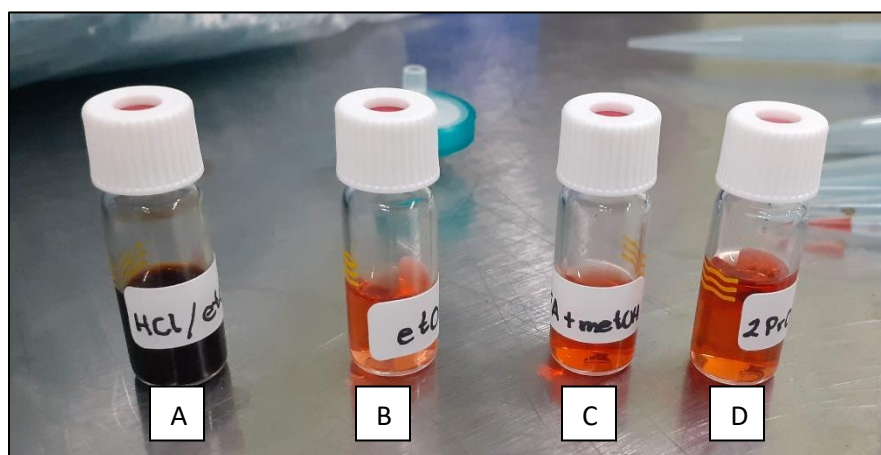
Como se ha mencionado, la estabilidad de las antocianinas es dependiente de varios factores, algunos de los principales son la temperatura, el pH del medio, la luz y el oxígeno.

En este trabajo, la temperatura, la luz y el oxígeno fueron constantes para todas las muestras, y el pH fue el factor variable.

El extracto obtenido mediante etanol acidificado con HCl 1N tuvo pH 1.0, por lo que hubo mayor estabilidad de las antocianinas; gracias a ello presentó una coloración más fuerte en comparación con las demás.

9.2 Identificación de antocianinas; Análisis por HPLC-UV/vis

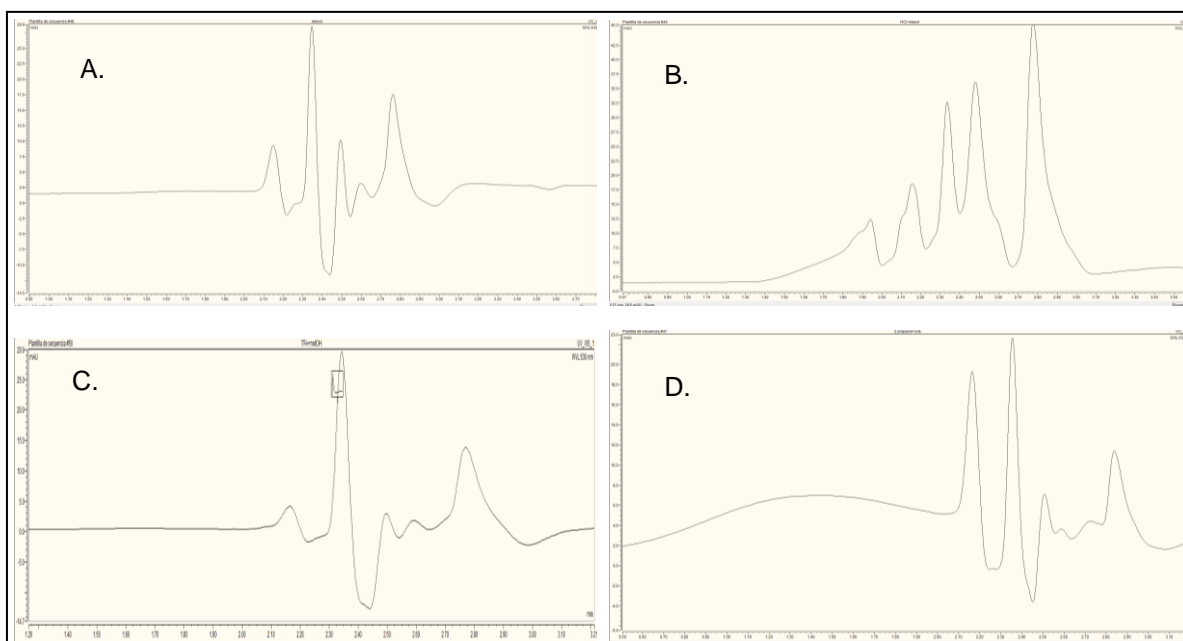
Luego de re suspender las muestras en metanol, se observaron las coloraciones presentadas, en los viales con las muestras obtenidas a partir de los métodos 1, 3 y 4 se observaron tonos muy parecidos, mientras que la muestra obtenida con el método 2 (etanol 96°GL con HCl 1N) presentó una coloración más oscura, debido a que este método presentó el pH más bajo, ayudando a tener una mayor estabilidad de las antocianinas y con ello mayor concentración de extracción (figura 5).



(A) Etanol 96°GL con HCl 1N. (B) Etanol al 70%. (C) TFA 1% en metanol grado reactivo. (D) 2-PrOH 60% con SDS 1%.

Figura 5. Viales con muestras liofilizadas re suspendidas en 3ml de metanol.

Se realizó el análisis correspondiente en HPLC, con las muestras de la figura 5 y un blanco, con ello se obtuvo un cromatograma por cada una de las muestras. Las cinco muestras analizadas presentaron cinco picos bien marcados, los cuales pueden representar algún tipo de antocianina, sin embargo, a pesar de que los tiempos de retención se encuentran dentro del mismo rango, no se puede garantizar que sean los mismos compuestos. En la figura 6 se muestran los cromatogramas de cada muestra inyectada.



A. Muestra del método 1; B. Muestra del método 2; C. Muestra del método 3; D. Muestra del método 4.

Figura 6. Cromatogramas de las muestras inyectadas en el equipo de HPLC.

Al realizar la identificación de las antocianinas no siempre se conocen los tiempos de retención para cada condición de elución evaluada, por lo que tomando en cuenta el tiempo de retención de cada pico se decidió realizar una comparación con reportes bibliográficos para determinar qué tipo de antocianina puede ser identificada, sin embargo al no contar con la misma técnica de elución se realizó su caracterización mediante un método por diferencia de tiempo de relación normalizado, ya que este método es independiente del disolvente usado durante el análisis.

9.2.1 Análisis del Método de extracción 1.

A partir del cromatograma del extracto con el método 1 se obtuvieron los tiempos de retención mostrados en el cuadro 7. Para el análisis de tiempos normalizados se procedió a obtener los valores mediante la fórmula establecida en la metodología.

Los tiempos de retención normalizados que se muestran en el cuadro 7 así como la diferencia del tiempo de retención normalizada, permiten comparar los datos obtenidos con los resultados de otras fuentes bibliográficas, encontrando similitud por la antocianina 2 (método 1, color azul) del cuadro 7, con la antocianina 5 (Fernandez-Aulis, *et. al.*, 2019; color azul) que se puede observar en el cuadro 8.

Cuadro 7. Tiempos de retención, T_R normalizado y diferencia de T_R normalizado, así como la amplitud de cada pico del cromatograma con la solución extractora 1 (etanol 70%)

Pico	T_R	Amplitud	T_R normalizado	Diferencia de T_R normalizado
1	2.15	9.4	3.77192982	
2	2.35	28.8	4.12280702	0.35087719
3	2.49	10.2	4.36842105	0.24561404
4	2.6	3.1	4.56140351	0.19298246
5	2.72	17.5	4.77192982	0.21052632

Cuadro 8. Tiempos de retención, T_R normalizado y diferencia de T_R normalizado, de acuerdo con Fernández-Aulis, 2019.

Pico	T_R	T_R normalizado	Diferencia de T_R normalizado	Antocianina
1	9	0.76923077		Cianidin-3-glucoside
2	12.6	1.07692308	0.30769231	Pelargonidin-3-glucoside
3	13.8	1.17948718	0.1025641	Peonidin-3-glucoside
4	15.3	1.30769231	0.12820513	Cianidin-3-(6"-malonylglucoside)
5	19.6	1.67521368	0.36752137	Pelargonidin-3-(6"-malonylglucoside)
6	20.7	1.76923077	0.09401709	Peonidin-3-(6"-malonylglucoside)

(Fernandez-Aulis, *et. al.*, 2019)

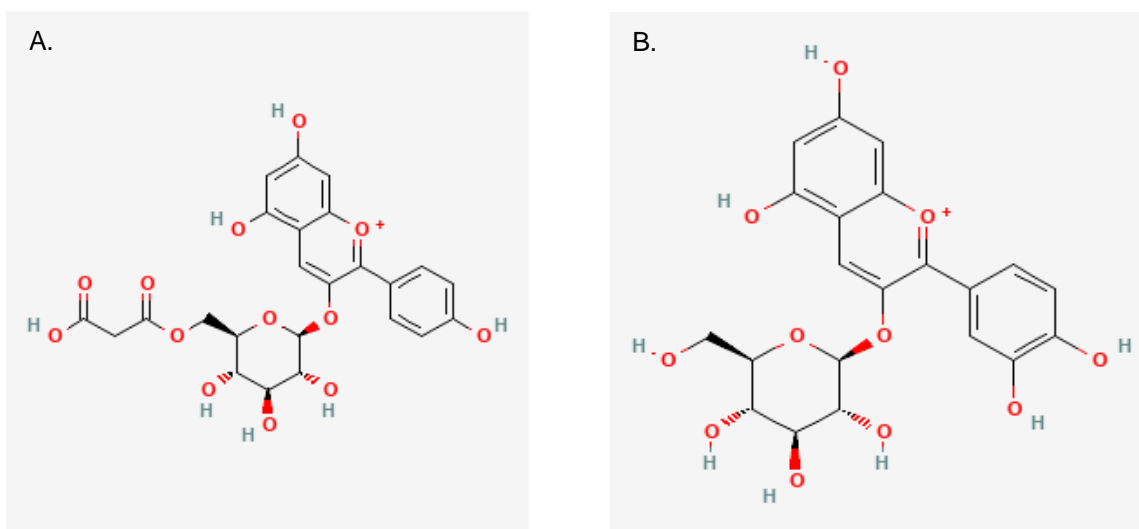
Por otro lado, utilizando el reporte de Min-kyoung, *et. al.*, 2008, con el mismo método de diferencia de tiempos normalizados se observa que de la antocianina 4 (método 1, color naranja) corresponde a la antocianina 3 (Min-kyoung, *et. al.*, 2008, color naranja) del cuadro 9.

Cuadro 9. Tiempos de retención, T_R normalizado y diferencia de T_R normalizado, de acuerdo con Min-kyoung, 2008.

Pico	T_R	T_R normalizado	Diferencia de T_R normalizado	Antocianina
1	13.6	0.62672811		Delphinidin-3-glucoside
2	14.5	0.66820276	0.04147465	desconocido
3	18.9	0.87096774	0.20276498	cyanidin-3-glucoside
4	23.6	1.0875576	0.21658986	petunidin-3-glucoside
5	35.3	1.62672811	0.53917051	Desconocido

(Min-kyoung, *et. al.*, 2008)

Al realizar las comparaciones bibliográficas, podemos determinar que la antocianina 2 obtenida con el método 1, corresponde a Pelargonidina-3-(6''-malonil glucósido), mientras que la antocianina 4 se identificó como cianidina-3-glucósido, ambas se muestran en la figura 7. Sin embargo, el resto de las antocianinas, no se lograron identificar.



A. Pelargonidin 3-O-(6-O-malonyl-beta-D-glucoside); B. Cyanidin 3-O-glucoside

Figura 7. Estructuras químicas de las antocianinas encontradas en el método de extracción 1.

9.2.2 Análisis del Método de extracción 2.

Con la segunda muestra obtenida con el método de extracción 2 se obtuvieron los tiempos de retención y los tiempos de retención normalizados que se visualizan en el cuadro 10, estos resultados fueron comparados con los datos de otros estudios publicados. Se encontró coincidencia de la antocianina 3 (Método 2, color rojo) con la antocianina 4 (Min-kyoung, *et. al.*, 2008, color rojo) del cuadro 9.

Con el mismo método, se encontró la similitud de la antocianina 5 (método 2, color verde) con la antocianina 2 (Dae-Woon, *et. al.*, 2021, color verde) mostrada en el cuadro 11.

Cuadro 10. Tiempos de retención, T_R normalizado y diferencia de T_R normalizado, así como la amplitud de cada pico del cromatograma con la solución extractora 2 (etanol 70% acidificado con HCl 1N).

Pico	T_R	Amplitud	T_R normalizado	Diferencia de T_R normalizado
1	1.94	12.5	2.30952381	
2	2.15	18.5	2.55952381	0.25
3	2.33	32.5	2.773809524	0.214285714
4	2.48	36.1	2.952380952	0.178571429
5	2.78	46	3.30952381	0.357142857

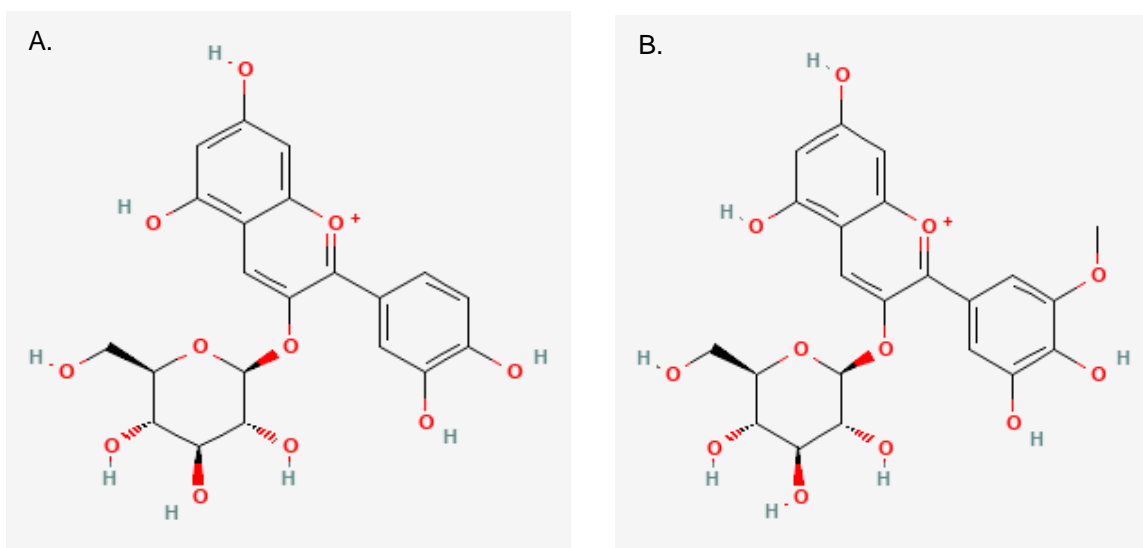
Cuadro 11. Tiempos de retención, T_R normalizado y diferencia de T_R normalizado, de acuerdo con Dae-Woon, 2021.

Pico	T_R	T_R normalizado	Diferencia de T_R normalizado	Antocianina
1	6.5	2.03125		Cyanidin-galactoside
2	7.6	2.375	0.34375	Cyanidin-glucoside
3	9.1	2.84375	0.46875	Cyanidin-arabioside
4	9.7	3.03125	0.1875	Petunidin-arabioside

(Dae-Woon, *et. al.*, 2021)

De acuerdo con este resultado, se determinó que la antocianina 5 obtenida con el método 2 corresponde a cianidina-glucósido y la antocianina 3 se identificó como petunidina-3-glucósido; las antocianinas 1, 2 y 4 no se encontró similitud con alguna

fuentes bibliográficas. Las estructuras de las antocianinas encontradas se pueden ver en la figura 8.



A. Cyandin 3-O-glucoside; B. Petunidin 3-O-glucoside

Figura 8. Estructuras químicas de las antocianinas encontradas en el método de extracción 2.

9.2.3 Análisis del Método de extracción 3.

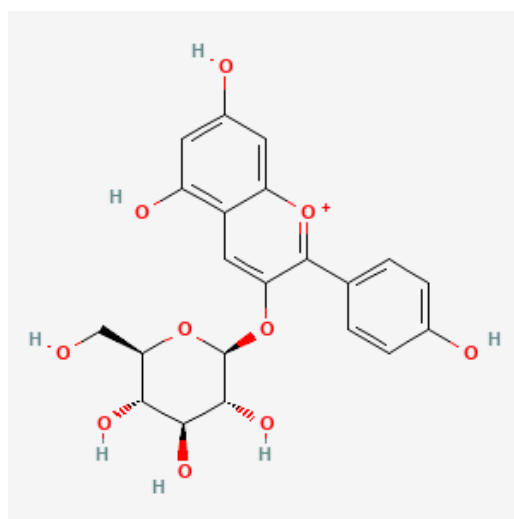
La siguiente muestra para analizar es la obtenida con el método de extracción 3, los datos obtenidos de tiempos de retención normalizados y las diferencias correspondientes se encuentran en el cuadro 12. Cada tiempo de retención normalizado se comparó con los resultados de fuentes bibliográficas.

De los cinco picos obtenidos en este cromatograma, sólo se pudo identificar la antocianina 5 (método 3, color rosa) la cual coincide con la antocianina 2 (Fernandez-Aulis, *et. al.*, 2019, color rosa) presente en el cuadro 8.

La antocianina 5 fue identificada como Pelargonidin-3-glucósido (figura 9), con respecto a las demás antocianinas no se identificaron con alguna fuente bibliográfica.

Cuadro 12. Tiempos de retención, T_R normalizado y diferencia de T_R normalizado, así como la amplitud de cada pico del cromatograma con la solución extractora 3 (metanol con TFA 1%).

Pico	T_R	Amplitud	T_R normalizado	Diferencia de T_R normalizado
1	2.16	4.1	3.540983607	
2	2.34	29.5	3.836065574	0.295081967
3	2.49	3	4.081967213	0.245901639
4	2.58	2	4.229508197	0.147540984
5	2.77	14	4.540983607	0.31147541



Pelargonidin 3-O-glucoside

Figura 9. Estructuras químicas de las antocianinas encontradas en el método de extracción 3.

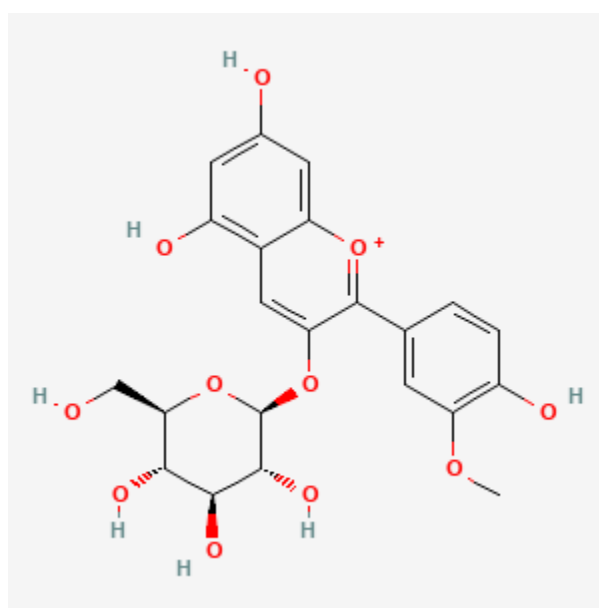
9.2.4 Análisis del Método de extracción 4.

Por último, los resultados de la muestra con el método de extracción 4 analizan en el cuadro 13, donde al igual que los resultados anteriores, se compararon los tiempos de retención normalizados con los de diferentes trabajos.

En este caso, se hizo la comparación con diferentes bibliografías y se encontró solamente una similitud de la antocianina 4 (método 4, color amarillo) con la antocianina 3 (Fernandez-Aulis, *et. al.*, 2019, color amarillo) mostrada en el cuadro 8. Esta antocianina fue identificada como Peonidin-3-glucósido de acuerdo con Fernández-Aulis, *et. al.*, 2019.

Cuadro 13. Tiempos de retención, T_R normalizado y diferencia de T_R normalizado, así como la amplitud de cada pico del cromatograma con la solución extractora 4 (2 propanol con SDS).

Pico	T_R	Amplitud	T_R normalizado	Diferencia de T_R normalizado
1	2.16	19.4	3.17647059	
2	2.35	22.6	3.45588235	0.27941176
3	2.51	7.1	3.69117647	0.23529412
4	2.58	3.6	3.79411765	0.10294118
5	2.84	11.5	4.17647059	0.38235294



Peonidin 3-glucoside

Figura 10. Estructuras químicas de las antocianinas encontradas en el método de extracción 4.

De acuerdo con los resultados mostrados, cada método de extracción tuvo diferente actividad y basándonos en los tiempos de retención de los cromatogramas podemos deducir que las antocianinas extraídas fueron diferentes en cada extracto, ya que no guardaron la misma relación entre sí. Este resultado también se debe a que cada alcohol tiene una preferencia distinta a cada antocianina, lo que da lugar a las diferencias presentadas.

De las antocianinas identificadas, hubo una que se presentó en distintos extractos, esta fue la cianidina-3-glucósido que se identificó en el extracto con el método 1 y

con el método 2, aunque ambas no coincidieron en el número de pico, ya que depende directamente de cómo avanzo la muestra respecto a otra.

Otro compuesto constante fue la antocianidina pelargonidina en los extractos obtenidos con el método 2 y el método 5, sin embargo, el sacárido fue diferente en cada extracto lo que nos da lugar a dos antocianinas diferentes, una es la pelargonidina-3-glucósido y la pelargonidina-3-(6"-malonylglucosido); esto da lugar a las diferentes polaridades de los extractos.

9.3 Comparación de antocianinas obtenidas en el estudio HPLC-UV/Vis

Con el cromatograma obtenido del método 1, se determinaron las amplitudes de cada uno de los picos, estos datos se observan en el cuadro 14. Podemos observar que la antocianina con mayor amplitud, es decir con mayor concentración obtenida, fue la antocianina 2 la cual fue identificada como Pelargonidina-3-(6"-malonil glucósido). La siguiente antocianina con mayor concentración fue la antocianina 5, seguida de las antocianinas 1 y 3, sin embargo, no fue posible identificarlas; finalmente la antocianina con menor concentración fue la 4, identificada como cianidina-3-glucósido.

Cuadro 14. Amplitud e identificación de antocianinas método de extracción 1.

Pico	Amplitud	Antocianina
1	9.4	N.I.
2	28.8	Pelargonidina-3-(6"-malonil glucósido)
3	10.2	N.I.
4	3.1	Cianidina-3-glucósido
5	17.5	N.I.

N.I.= No Identificado

En lo que respecta a los resultados del método de extracción 2, podemos determinar que la antocianina 5 fue la que presentó mayor amplitud. Al realizar las comparaciones bibliográficas, se determinó que esta antocianina corresponde a cianidina-glucósido; la siguiente antocianina que tuvo mayor concentración fue la

antocianina 4, la cual no se pudo identificar, y en tercer lugar se encontró la antocianina 3 que se identificó como petunidina-3-glucósido; estos resultados se analizan en el cuadro 15.

Cuadro 15. Amplitud e identificación de antocianinas método de extracción 2.

Pico	Amplitud	Antocianina
1	12.5	N.I.
2	18.5	N.I.
3	32.5	Petunidina-3-glucósido
4	36.1	N.I.
5	46	Cianidina-glucósido

N.I.= No Identificado

En el cuadro 16 se analizaron los datos obtenidos del método 3, de acuerdo con la amplitud de los picos obtenidos, el que presento mayor proporción fue la antocianina 2, sin embargo, no fue identificada al igual que las demás; con excepción de la antocianina 5 que se puede identificar de acuerdo con Fernandez-Aulis, 2019, como Pelargonidina-3-glucósido.

Cuadro 16. Amplitud e identificación de antocianinas método de extracción 3.

Pico	Amplitud	Antocianina
1	4.1	N.I.
2	29.5	N.I.
3	3	N.I.
4	2	N.I.
5	14	Pelargonidina-3-glucósido

N.I.= No Identificado

Finalmente, con los resultados del método de extracción 4 mostrados en el cuadro 17, se determinó que la antocianina 2 presentó mayor concentración, sin embargo, no fue identificada; mientras que la antocianina 4 presentó menor concentración

(amplitud) y fue identificada de acuerdo con la bibliografía como peonidin-3-glucósido.

Cuadro 17. Amplitud e identificación de antocianinas método de extracción 4.

Pico	Amplitud	Antocianina
1	19.4	N.I.
2	22.6	N.I.
3	7.1	N.I.
4	3.6	Peonidin-3-glucósido
5	11.5	N.I.

N.I.= No Identificado

De acuerdo con los resultados analizados, se determinó que, de acuerdo a sus valores de amplitud, el extracto que tuvo un mejor rendimiento fue el extracto obtenido con el método 2 (etanol 70% acidificado con HCl 1N), ya que los valores de amplitud de los picos fueron superiores a las amplitudes de los picos de los demás métodos, presentando picos más altos y mejor definidos.

Uno de los factores que tuvo variación entre cada método fue el pH, un factor que juega un papel importante en la estabilidad de las antocianinas y ayuda a tener una mejor extracción. En el método 1, no se aplicó algún componente adicional que acidificara el alcohol por lo que la extracción tuvo menor concentración; con el método 2, el ácido clorhídrico al ser un ácido fuerte, disminuyó el pH de la solución extractora, dando lugar a que las antocianinas tuvieran una mejor estabilidad y la concentración extraída fuera mayor que las demás muestras; en el caso del método 3 y el método 4, el pH no disminuyó lo suficiente para lograr una mejor extracción, ya que el TFA al ser un ácido débil y el SDS ser una base, no fueron un componente importante que ayudara a acidificar el medio.

De igual forma, con este análisis se demuestra que con cada método se extrajeron diferentes antocianinas, y que los diferentes alcoholes usados presentan afinidad por diferentes tipos de antocianinas, sin embargo, no se pudo identificar cada una de las antocianinas extraídas con cada método.

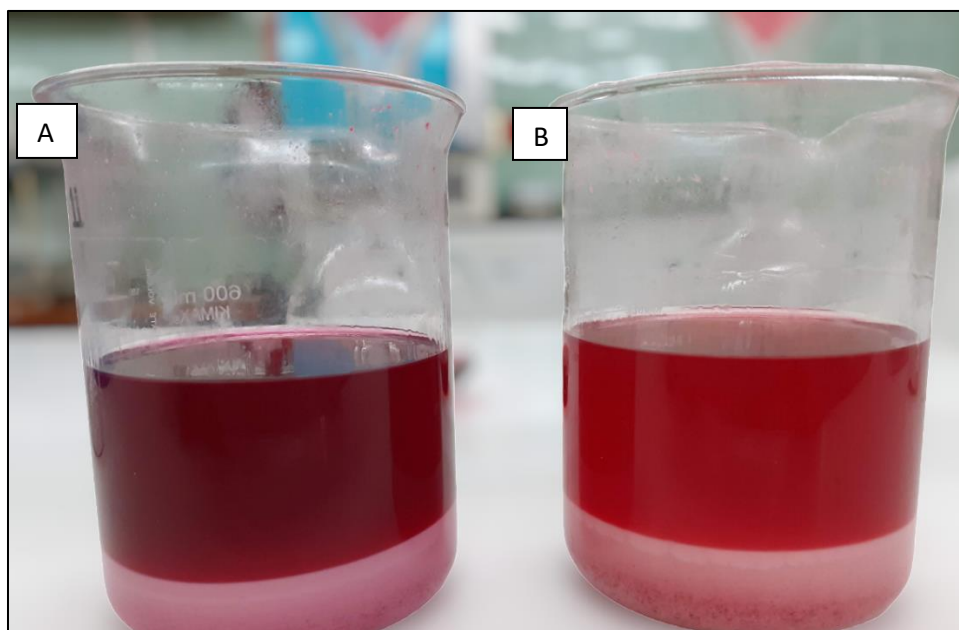
9.4 Adaptación de la metodología seleccionada.

Teniendo en cuenta que la metodología con mejor resultado fue la empleada con etanol acidificado con HCl 1N, se usó el mismo principio, acidificando el medio con algún reactivo grado alimenticio en lugar de HCL. Para ello, se empleó ácido cítrico logrando así acidificar el etanol 90° a pH de 3.5, debido a que este es el pH de la sidra, evitando alteraciones en nuestra bebida empleada.

Una vez establecida la solución extractora se realizó el procedimiento completo, añadiendo lentamente la harina de maíz azul y rojo a la SE en diferentes frascos. Después de permanecer 24 horas en refrigeración y de filtrar las muestras, se obtuvo dos extractos con tonalidades parecidas en comparación a los extractos de etanol acidificado con HCl 1N. En la figura 11 se observan ambos extractos.

Cada extracto fue concentrado en estufa a una temperatura máxima de 60°C para evitar afectar las antocianinas, esto con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de etanol posible. Luego de tres días secando en la estufa, quedaron extractos más concentrados; se obtuvo menor cantidad y el color fue más intenso que al principio. En la figura 12 se visualiza el cambio que tuvo luego de concentrar las muestras.

De esta manera, se obtuvo una muestra concentrada, teniendo un extracto con consistencia espesa de antocianinas y ácido cítrico; este extracto fue añadido en la matriz seleccionada.



A) Extracto de la harina de maíz azul. B) Extracto de la harina de maíz rojo.

Figura 11. Extractos filtrados obtenidos con la metodología adaptada, después de 24 horas en refrigeración.

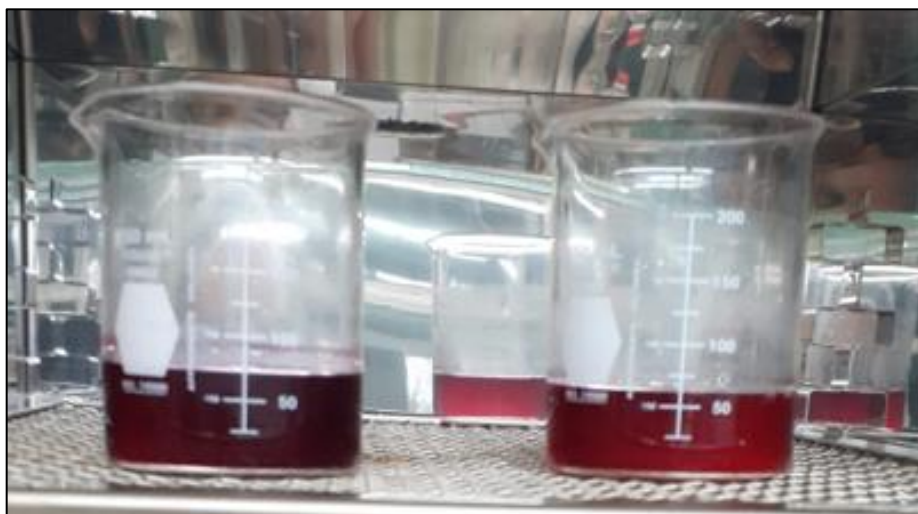


Figura 12. Extracto de antocianinas a partir de maíz criollo rojo y azul luego de concentrarse durante tres días en estufa a una temperatura máxima de 60°C.

9.5 Aplicación del extracto en la sidra.

Una vez que se obtuvo el extracto concentrado, estuvo listo para agregarlo a la muestra de sidra. La sidra tiene color ámbar y la finalidad de agregar las antocianinas es que le proporcionen color para obtener sidra rosada.

Se fue agregando la sidra poco a poco en el extracto de antocianinas, sin embargo, con la última cantidad agregada, se observó que la coloración se iba haciendo más clara y perdía el tono requerido para realizar una sidra rosada.

En la figura 13 y 14 se presenta el color obtenido con diferentes cantidades de sidra añadidas y la misma cantidad de extracto de antocianinas de maíz azul. Podemos notar que la tonalidad presente en la muestra con 130 ml de sidra es más opaca, siendo un color que no es del interés en la realización de sidra rosada para la industria sidrera. En todo caso, se puede utilizar para alguna otra bebida alcohólica preparada, añadiendo también saborizantes.

Por ello se determinó que la relación ideal de sidra y extracto de antocianina es de 100 ml-20 ml respectivamente.



Figura 13. Muestra de 100ml de sidra con 20 ml de extracto de antocianinas de maíz azul.



Figura 14. Muestra de 130ml de sidra con 20 ml de extracto de antocianinas de maíz azul.

En el caso del extracto de antocianinas a partir de maíz rojo, se usó la misma técnica descrita anteriormente donde se fue agregando poco a poco la cantidad de sidra al extracto previamente medido. En la figura 15 y 16 podemos notar la diferencia de

color al agregar diferente cantidad de sidra, la muestra con 130 ml de sidra se ve más opaca que la muestra con 100 ml de sidra.

Teniendo en cuenta que el color obtenido en el extracto concentrado fue más claro a comparación del extracto del maíz azul, al agregar la sidra también se observó una diferencia en la tonalidad resultante.

Usar las antocianinas del maíz rojo como colorante para producir sidra rosada resulta no ser totalmente viable, debido a que no se obtiene el color deseado. Sin embargo, se puede aplicar en bebidas alcohólicas preparadas donde se emplean saborizantes.



Figura 15. Muestra de 100ml de sidra con 20 ml de extracto de antocianinas de maíz rojo.



Figura 16. Muestra de 130ml de sidra con 20 ml de extracto de antocianinas de maíz rojo.

9.6 Análisis fisicoquímicos.

Se realizaron algunos análisis fisicoquímicos al producto (sidra con extracto de antocianinas) y se compararon con los análisis de la sidra sin el extracto.

9.6.1 pH

Con un potenciómetro se midió el pH de las tres muestras de interés, dos blancos que fueron la sidra y el extracto de antocianinas por separado y la muestra de interés que es la sidra con el extracto de antocianinas.

Las lecturas que se tomaron fueron las siguientes:

La sidra tuvo un pH de 3.45, que es el pH óptimo para cumplir con los estándares de calidad de acuerdo con las normas.

Los extractos de antocianinas a partir del maíz azul y rojo tuvieron un pH de 3.5, el mismo pH inicial que tuvo la SE.

Finalmente, la lectura de la muestra de sidra con extracto de antocianinas a partir del maíz azul fue de 3.5, dando la misma lectura en la sidra con extracto de antocianinas a partir del maíz rojo; siendo el pH ideal de acuerdo con los estándares de calidad para la sidra. De esta forma, determinamos que no se produce una variación significativa en el pH del producto final.

9.6.2 Turbidez

La turbidez se midió con un turbidímetro, una vez realizado el proceso de calibración se tomaron las lecturas de las muestras de interés, dando las lecturas que se muestran a continuación en el cuadro 18.

Cuadro 18. Resultados de turbidez.

MUESTRA	VALOR (NTU)
Sidra	2.65 NTU
Extracto de antocianinas del maíz azul	847 NTU
Extracto de antocianinas del maíz rojo	875 NTU
Sidra con extracto de antocianinas del maíz azul	126 NTU
Sidra con extracto de antocianinas del maíz rojo	130 NTU

En base a estos resultados se observa que la turbidez en los extractos es muy alta, esto puede deberse a que no se realizó ningún proceso de purificación o microfiltración después de la adición del extracto a la sidra, por lo que éste podría ser un interferente en la prueba.

9.6.3 Proteínas

Se realiza la determinación de proteínas por el método de Biuret. De acuerdo con la bibliografía y análisis previos a la sidra, se sabe que no contiene proteínas, por lo que su análisis se realizó para confirmar que el método de extracción aplicado no extrae trazas de proteínas.

Se espera que al realizar la prueba de Biuret, todas las muestras presenten tonalidades azules, lo que daría resultado negativo a la presencia de proteínas. En la figura 17 se observan los tubos de ensayo donde se realizó la prueba, de un lado está la muestra de sidra con extracto de antocianinas de maíz azul y del otro lado la muestra de sidra con extracto de antocianinas de maíz rojo, ambos dieron resultados negativos a la prueba de Biuret.



El tubo del lado derecho es la muestra con sidra y extracto de antocianinas con maíz azul y del lado izquierdo la muestra con sidras y extracto de antocianinas con maíz rojo.

Figura 17. Tubos de ensayo con la prueba de Biuret negativa.

De acuerdo con los resultados conseguidos, solamente se vio afectada la turbidez, esto fue causado por no llevar a cabo la microfiltración o clarificación de la sidra con el extracto. El pH se mantuvo igual debido a que el extracto tuvo el mismo pH; en cuanto a las proteínas no hubo trazas extraídas, por lo que el resultado se mantuvo negativo. En el cuadro 19 se concentran los resultados de los análisis fisicoquímicos.

Cuadro 19. Resultados de análisis fisicoquímicos.

pH	TURBIDEZ (NTU)	PROTEINAS
SIDRA		
3.5	2.65	Ausencia
SIDRA CON EXTRACTO DE ANTOCIANINAS DE MAIZ AZUL		
3.5	126	Ausencia
SIDRA CON EXTRACTO DE ANTOCIANINAS DE MAIZ AZUL		
3.5	130	Ausencia

X. CONCLUSIÓN

Al realizar la comparación de los cuatro diferentes métodos de extracción mediante HPLC, se determinó que el mejor método de extracción fue el empleado con solución extractora 2, donde el medio se encontraba acidificado. Con estos resultados se demostró que las mejores condiciones para la extracción y estabilidad de las antocianinas son pH ácido, temperaturas bajas y poca luz o evitar la luz directa. Los extractos obtenidos bajo estas condiciones presentaron coloraciones más fuertes, indicando mayor concentración de antocianinas.

Al tener claras las condiciones ideales para obtener un buen resultado, es importante aplicarlas al momento de realizar una extracción de tal manera que se aplique a gran escala (nivel industrial), además de usar reactivos que sean de grado alimenticio para hacer más efectivo el proceso de producción. En este caso se modificó la metodología utilizando ácido cítrico para acidificar el medio y llevar a cabo la extracción, de esta manera la eliminación del ácido cítrico puede ser parcial, ya que éste reactivo es utilizado en la producción de sidra.

Esta modificación empleada en la solución extractora dio buen resultado ya que los extractos obtenidos, luego de concentrarse, presentaron coloraciones muy parecidas a los extractos con la solución extractora 2. Además, con la modificación empleada fue más sencillo llevar a cabo la concentración del extracto.

La sidra tiene un pH de 3.5, se almacena en refrigeración y es envasada en botellas verdes o ámbar, favoreciendo la estabilidad de las antocianinas. Otra ventaja de agregar a la sidra antocianinas es que se aumentan sus propiedades antioxidantes, además de aprovechar su color para sustituir los colorantes convencionales utilizados. Sin embargo, al aplicarlo en la sidra y combinarse con el color ámbar se perdió la coloración inicial, por ello el color resultante no fue el ideal para la elaboración de sidra rosada.

Existen otras bebidas alcohólicas preparadas a base de sidra que usan colorantes y saborizantes, por ejemplo, bebidas sabor durazno, fresa o tinto. En estas bebidas se puede aplicar el extracto que se obtuvo como colorante, ya que se presentan con coloraciones más tenues.

Al agregar el extracto a la sidra y realizar los análisis, el pH no se vio alterado; aunque la turbidez si presentó cambios significativos. Las lecturas obtenidas de turbidez son muy altas comparadas con la sidra sin extractos, esto representa un problema ya que no cumple con los estándares de calidad. Esto se puede reducir con algunos procesos de filtración y microfiltración usados en la industria sidrera, sin embargo, no se podría reducir tan fácil la turbidez a los parámetros necesarios.

Utilizar a las antocianinas como pigmentos en la industria de alimentos tiene un gran potencial, sin embargo, es necesario evaluar y optimizar cada etapa del proceso en cuanto a tiempo y recursos utilizados, además de considerar que los alimentos a los que se le adicionen tengan las condiciones adecuadas para que las antocianinas conserven su estabilidad y sus propiedades funcionales.

XI. REFERENCIAS

- Aguilera-Ortíz, M., Alanis-Guzmán, M., García-Díaz, C., & Hernández-Brenes, C. (2009). Caracterización y estabilidad de antocianinas de higo, variedad Mission. *Universidad y ciencia*, 25(2), 151-158.
- Aguilera-Otíz, M., Reza-Vargas, M., Chew-Madinaveita, R., & Meza-Velázquez, J. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad de Sonora.*, 13(2), 16-22.
- Alappat, B., & Alappat, J. (2020). Anthocyanin Pigments: Beyond Aesthetics. *Molecules*, 25(23), 5500. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules25235500>
- Alvarez-Suarez, J., Giampieri, F., Tulipani, S., Casoli, T., Di Stefano, G., González-Paranamás, A., . . . Battino, M. (2014). One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(3), 289-294.
- Antón, M., Suarez, B., & Picinelli, A. (2011). La naturaleza química del aroma de la sidra. *Tecnología Agroalimentaria.Boletín Informativo del SERIDA.*(10), 33-38.
- Arencibia, J., Rodríguez, D., Casariego, A., & García, M. (2018). Optimización de la extracción de antocianinas a partir de manzana malaya (*Syzygium malaccense*). *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, 4(1), 65-76.
- Arrazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2013). Obtención y Evaluación de la Estabilidad de Antocianinas de Berenjena (*Solanum melongena* L.) en Bebidas. *Información tecnológica*, 25(3), 43-45. doi:doi: 10.4067/S0718-07642014000300007
- Arrazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2014). Microencapsulación de antocianinas de berenjena (*Solanum melongena* L.) mediante secado por aspersión y evaluación de la estabilidad de su color y capacidad antioxidante.

Información Tecnológica, 25(3), 31-42. doi:10.4067/S0718-07642014000300006

Arroyave, J., Garcés, L., Arango, A., & Agudelo, C. (2008). La Tartrazina, un colorante de la industria agroalimentaria, degradado mediante procesos de oxidación avanzada. *Lasallista de Investigación*, 5(1).

Barros-Santos, C. (2008). *Los aditivos en la alimentación de los españoles y la legislación que regula su autorización y uso*. Madrid, España: Visión Libros.

Barrows, J., Lipman, A., & Bailey, c. (11 de Marzo de 2017). FDA. Obtenido de Color Additives History: <https://www.fda.gov/industry/color-additives/color-additives-history#authors>

Bechtold, T., Mahmud-Ali, A., & Mussak, R. (2007). Anthocyanin dyes extracted from grape pomace for the purpose of textile dyeing. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 70(2), 656-668. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.3013>

Benchikh, Y., Aissaoui, A., Allouch, R., & Mohellebi, N. (2021). Optimising anthocyanin extraction from strawberry fruits using response surface methodology and application in yoghurt as natural colorants and antioxidants. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 1987-1995. doi:<https://doi.org/10.1007/s13197-020-04710-0>

Cameán, A., & Repetto, M. (2016). *Toxicología alimentaria*. Madrid: Diaz de Santos S.A.

Castillo, N. (27 de agosto de 2020). *Ciencia UNAM*. Obtenido de Sangre de nopal. El rojo mexicano de la grana cochinilla: <http://ciencia.unam.mx/leer/1031/sangre-de-nopal-el-rojo-mexicano-de-la-grana-cochinilla>

Chen, X., Zhou, J., Luo, L., Han, B., Li, F., Chen, J., . . . Yu, X. (2015). Black Rice Anthocyanins Suppress Metastasis of Breast Cancer Cells by Targeting RAS/RAF/MAPK Pathway. *Niomed research international*. doi:<https://doi.org/10.1155/2015/414250>

- CINVESTAV, C. (19 de junio de 2019). *Conexión CINVESTAV*. Obtenido de Recuperación de un colorante prehispánico: <https://conexion.cinvestav.mx/Publicaciones/recuperaci243n-de-un-colorante-prehisp225nico>
- Colindres, M., & Chinchilla, J. (2018). *Evaluación de la aceptabilidad de dos productos cosméticos elaborados a partir del pigmento extraído del maíz negro (Zea mays) de Guatemala*. [Tesis de maestría no publicada]: Universidad de San Carlos Guatemala.
- CONABIO. (02 de 10 de 2020). *Biodiversidad mexicana*. Obtenido de Razas de maíz de México: <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/maices/razas-de-maiz>
- CONANP. (2016). *Programa de Conservación de Maíz Criollo en México*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- Cousin, F., Le Guellec, R., Schlusshuber, M., Laplace, J., & Cretenet, M. (2017). Microorganisms in Fermented Apple Beverages: Current Knowledge and Future Directions. *Microorganisms*, 5(3), 11-22. doi:10.3390/microorganisms5030039
- Cowan, C. (22 de mayo de 2019). *International maize and wheat improvement center*. Obtenido de CIMMYT: <https://www.cimmyt.org/es/noticias/tras-los-pasos-del-maiz-criollo-50-anos-despues/>
- Dan, L., Yuhua, Z., Yan, L., Ruifang, S., & Min, X. (Abril de 2015). Purified Anthocyanin Supplementation Reduces Dyslipidemia, Enhances Antioxidant Capacity, and Prevents Insulin Resistance in Diabetic Patients. *The Journal of Nutrition*, 145(4), 742-748. doi:<https://doi.org/10.3945/jn.114.205674>
- Del Carpio, K., Serrano, C., & Giusti, M. (2009). Caracterización de las antocianinas de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler. *Rev Soc Quím*, 75(1), 76-86.

- DuPont, S., Bennet, R., Mellon, F., & Williamson, G. (2002). Polyphenols from Alcoholic Apple Cider Are Absorbed, Metabolized and Excreted by Humans. *The Journal of Nutrition*, 132(2), 172–175. doi:<https://doi.org/10.1093/jn/132.2.172>
- Durazzo, A., Lucarini, M., & Santini, A. (2020). Nutraceuticals in Human Health. *Foods*, 9(3). doi:<https://doi.org/10.3390/foods9030370>
- EFSA. (04 de Noviembre de 2013). *Elika, Seguridad Alimentaria*. Obtenido de Evaluación perfeccionada de la exposición al amaranto (E 123) : <https://seguridadalimentaria.elika.eus/evaluacion-perfeccionada-de-la-exposicion-al-amaranto-e-123-041113/>
- Elmadfa, I., Muskat, E., & Fritzsche, D. (2011). *Tabla de aditivos los números E*. Barcelona, España: Editorial Hispano Europea, S.A.
- Escalante, A., Ramírez, B., Torres, P., & al, e. (2013). LA NIXTAMALIZACIÓN Y SU EFECTO EN EL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS DE MAÍCES PIGMENTADOS, UNA REVISIÓN. *Rev. Fitotec. Mex.*, 36(4), 429 - 437.
- Espinosa-Trujillo, E. (2012). *Bioquímica y Genética de las Antocianinas del Grano de Maíz. 2012. INIFAP. MÉXICO*. Santiago de Querétaro: Aro Publicidad.
- Espinosa-Trujillo, E., Castillo-González, F., & Mendoza, C. (2009a). ANTOCIANINAS DEL GRANO DE POBLACIONES CRIOLLAS DE MAÍZ ROJO, AZUL Y PÚRPURA. *III Reunión Nacional para el Mejoramiento, Conservación y Uso de los Maíces Criollos*, (págs. 63-77). Celaya, Guanajuato.
- Espinosa-Trujillo, E., Mendoza, M., Castillo-González, F., Ortiz-Careceres, J., Delgado, A., & Carrillo, A. (2009b). ACUMULACIÓN DE ANTOCIANINAS EN PERICARPIO Y ALEURONA DEL GRANO Y SUS EFECTOS GENÉTICOS EN POBLACIONES CRIOLLAS DE MAÍZ PIGMENTADO. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(4), 303-309.

- Estela-Escalante, W., Rychtera, M., Melzoch, K., Torres-Ibáñez, F., Calixto-Cotos, R., Bravo-Araníbar, N., . . . Chávez-Guzmán, Y. (2014). Efecto de la aireación en la producción de compuestos volátiles por cultivo mixto de *Brettanomyces intermedius* y *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación de sidra. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 5-14.
- Faria A, P. D. (2010). Blueberry anthocyanins and pyruvic acid adducts: anticancer properties in breast cancer cell lines. *Phytother Research*, 24(12), 1862-1869.
- FDA. (19 de Abril de 2022). *Code of Federal Regulations*. Obtenido de 74.706 FD&C Amarillo No.6: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-A/part-74/subpart-A/section-74.706>
- FDA, I. &. (Abril de 2010). *A.U.S Food and Drug administration*. Obtenido de Overview of Food Ingredients, Additives & Colors: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/overview-food-ingredients-additives-colors>
- Flores-Aguilar, E., & Flores-Rivera, E. (2018). Estabilidad de Antocianinas, Fenoles totales y Capacidad Antioxidante de Bebidas de Maíz Morado (*Zea mays* L.) y Uña de Gato (*Uncaria tomentosa* sp). *Información Tecnológica*, 29(2), 175-184. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642018000200175>
- Fратиanni, F., De Giulio, A., Sada, A., & Nazzaro, F. (2012). Biochemical Characteristics and Biological Properties of Annurca Apple Cider. *Journal of Medicinal Food*, 15(1). doi: <https://doi.org/10.1089/jmf.2011.0042>
- García, L., Herrero, M., & González, A. (2010). *Tecnología de la elaboración de sidra. Equipamiento industrial*. (D. Blanco, & J. Mangas, Edits.) SERIDA, Universidad de Oviedo.
- Garzón, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3), 27-36.
- Gómez-Dávalos, M. (2017). *Sensient food colors*. Obtenido de La Cochinilla y el Carmín – Colores Naturales que son rentables:

<https://sensientfoodcolors.com/es-la/mercados-mundiales-o-mercados-globales/la-cochinilla-y-el-carmin-colores-naturales-que-son-rentables/>

- González-Cortés, N., Silos-Espino, H., Estrada-Cabral, J., Chavez-Muñoz, J., & Tejero-Jiménez, L. (15 de Mayo de 2016). Characteristics and properties of maize (*Zea mays* L.) grown in native Aguascalientes, Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(3), 669-680.
- Gutiérrez, P., Gutiérrez, C., Garduño, L., Ordaz, C., & al, e. (2019). Purple pigment from *Peltogyne mexicana* heartwood as a potential colorant for food. *J Food Sci Technol*, 57(6), 3225–3238. doi:<https://doi.org/10.1007/s13197-019-03779-6>
- Havva-Budak, N., Özçelik, F., & Güzel-Seydim, Z. (2015). Antioxidant Activity and Phenolic Content of Apple Cider. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 3(6), 356-360.
- Hellin, J., Keleman, A., López, D., Donnet, L., & Flores, D. (2013). LA IMPORTANCIA DE LOS NICHOS DE MERCADO. UN ESTUDIO DE CASO DEL MAÍZ AZUL Y DEL MAÍZ PARA POZOLE EN MÉXICO. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(6), 315-328.
- Hui, C., Bin, Y., Xiaoping, Y., Long, Y., Chunye, C., Mantian, M., & Wenhua, L. (2014). Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells in vitro and in vivo. *Journal Article*, 62(8), 1128-1136.
- Jimenez, M., Castillo, E., Azuara, E., & Beristain, C. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of capulin (*Prunus serotina* subsp capuli) extracts. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(1), 29-37.
- Jing, P., & Giusti, M. (2005). Characterization of Anthocyanin-Rich Waste from Purple Corncobs (*Zea mays* L.) and Its Application to Color Milk. *Journal Agric. Food Chemical*, 53(22), 8775-8781. doi:<https://doi.org/10.1021/jf051247o>

- Juárez, C. (02 de Junio de 2020a). *The food tech*. Obtenido de Color a primera vista: el uso de colorantes manera estratégica: <https://thefoodtech.com/ingredientes-y-aditivos-alimentarios/color-a-primera- vista-el-uso-de-colorantes-manera-estrategica/>
- Juárez, C. (7 de mayo de 2020b). *¿Cuáles son los colorantes naturales del momento?* Obtenido de The Food Thech: <https://thefoodtech.com/ingredientes-y-aditivos-alimentarios/los-colorantes- naturales-del-momento/>
- Khoo, H., Azlan, A., Tang, S., & Meng, S. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1). doi:<https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
- Kim SM, C. M. (2012). Neuroprotective effects of black soybean anthocyanins via inactivation of ASK1-JNK/p38 pathways and mobilization of cellular sialic acids. *Life Sci*, 90(21-22), 874-882. doi:10.1016/j.lfs.2012.04.025.
- Koh, E., Lim, J., Kim, M., & al., e. (2015). Anthocyanin-rich Seoritae extract ameliorates renal lipotoxicity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *Journal of Translational Medicine*, 13(203). doi:<https://doi.org/10.1186/s12967-015-0563-4>
- Koh, K., Youn, J., & Kim, H. (2014). Identification of anthocyanins in black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) varieties. *J Food Sci Technol*, 51, 377–381. doi:<https://doi.org/10.1007/s13197-011-0493-y>
- Lazos, E., & Chauvet, M. (2012). *Análisis del contexto social y biocultural de las colectas de maíces nativos en México. Proyecto global de maíces nativos. Informe de Gestión.*, CONABIO. Obtenido de http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/pdf/proyecto/Anexo9_Analisis_Especialistas/Lazos%20y%20Chauvet%202011.pdf

- Loarca-Piña, G., Neri, M., Figueroa, J. d., & al, e. (2019). Chemical characterization, antioxidant and antimutagenic evaluations of pigmented corn. *J Food Sci Technol*, 56(7), 3177-3184. doi:<https://doi.org/10.1007/s13197-019-03671-3>
- Marcano, D. (2018). *Introducción a la Química de los Colorantes*. (C. D. Tecnológica., Ed.) Venezuela, Caracas: Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales.
- Marina Zapata, L. (2014). *obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria*. [Tesis de maestría no publicada]: Universidad Politécnica de Valencia.
- Márquez-Sánchez, F. (2008). FROM CREOLE CORN VARIETIES (Zea mays L.), TO TRANSGENIC HYBRIDS. I: GERMPLASM COLLECTION AND IMPROVED CULTIVARS. *AGRICULTURA, SOCIEDAD Y DESARROLLO*, 5(2), 151-166.
- Mascarell, J., & Carné, S. (2011). Pigmentantes naturales: Combinación de xantofilas amarillas y rojas para optimizar su utilización en broilers. *Especial Alimentación*, 53(12), 13-16.
- Maslov, L., Mihaljević, M., Fruk, G., Skendrović Babojelić, M., Jemrić, T., & Jeromel, A. (2019). The profile of organic acids and polyphenols in apple wines fermented with different yeast strains. *J Food Sci Technol*, 56(2), 599–606. doi:10.1007/s13197-018-3514-2
- Merwin, I., Padilla-Zakour, O., & Valois, S. (2008). Cider Apples and Cider-Making Techniques in Europe and North America. *Horticultural reviews*, 34, 365-415. doi:10.1002/9780470380147.ch6
- Mex-Álvarez, R. M., Bolivar-Fernández, N., Garma-Quen, P., Tut-Heredia, J., & Romero-Guillén, K. (noviembre de 2013). Actividad antioxidante de cinco variedades de maíz cultivadas en Campeche, México. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12(6), 558-571.

- Milán Carrillo, J., Gutiérrez Dorado, R., Cuevas Rodríguez, E., Sánchez Magaña, L., Rochin Medina, J., & Reyes Moreno, C. (2017). Bebida funcional con potencial antidiabético y antihipertensivo elaborada con maíz azul y frijol bioprocesados. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(4), 451-459.
- Min J, Y. S. (2011). Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett*, 500(3), 157-161. doi:10.1016/j.neulet.2011.05.048
- Miyake, S. T. (2012). Vision preservation during retinal inflammation by anthocyanin-rich bilberry extract: cellular and molecular mechanism. *Laboratory Investigation*, 92, 102-109. doi:https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.132
- Nikbakht, E., Simgh, I., Vider, J., & al., e. (febrero de 2021). Potential of anthocyanin as an anti-inflammatory agent: a human clinical trial on type 2 diabetic, diabetic at-risk and healthy adults. *Inflammation research*, 70(3), 275-284. doi:10.1007/s00011-021-01438-1
- NOM-199-SCFI-2017. (s.f.). *Bebidas alcohólicas-Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba*. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 30 de octubre de 2017.
- Núñez, M., & Navarro, C. (2013). *Guia completa de aditivos alimentarios*. Barcelona: RBA Integral.
- Paik SS, J. E. (2012). Anthocyanins from the seed coat of black soybean reduce retinal degeneration induced by N-methyl-N-nitrosourea. *Experimental Eye Research*, 97(1), 55-62. doi:https://doi.org/10.1016/j.exer.2012.02.010
- Picinelli, A., Diñeiro, Y., Mangas, J., Rodríguez, R., & Suárez, B. (2009). Phenolic and antioxidant composition of cider. *Journal of food composition and analysis*, 22(7-8), 644-648. doi:https://doi.org/10.1016/j.jfca.2009.03.008
- Pojer E, M. F. (2013). The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 12(5), 483-508. doi:https://doi.org/10.1111/1541-4337.12024

- Ramírez, E., & Álvar, R. (2005). Efecto del Sulfitado y la Levadura sobre las Características Químicas de Sidra Tranquila. *Brazilian Journal of food technology*, 5.
- Rawdkuen, S., Faseha, A., tBenjakulc, S., & Kaewprachud, P. (2020). Application of anthocyanin as a color indicator in gelatin films. *Food Bioscience*, 36. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100603>
- Ríos Vasquez, L. (2019). *La química orgánica aplicada a nuestro diario vivir*. (L. Gallegos, Ed.) Manizales, Colombia: Universidad de Caldas.
- Rodoni, L., Massolo, F., Badin, E., Rossi, Y., & Moroni, F. (2017). Efecto del tratamiento térmico sobre el color y contenido de antocianinas en jugos de zarzamora y frambuesa. *I Congreso Argentino de Biología y Tecnología Poscosecha y IX Jornadas Argentinas de Biología y Tecnología Poscosecha* (págs. 197-206). Concordia, Entre Ríos: Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.
- Rodriguez, A., Esparza, C., & Huacho, I. (2019). Obtención de antocianinas de la Brassica oleracea var.Capitata para el uso en alimentos. *Dominio de las ciencias*, 5(1), 652-666. doi:<http://dx.doi.org/10.23857/dc.v5i1.1067>
- Rojano, B., Zapata, I., & Bernardo, F. (2012). Estabilidad de antocianinas y valores de capacidad de absorbanca de radicales oxígeno (ORAC) de extractos acuosos de corozo (*Bactris guineensis*). *Revista Cubana de Plantas Medicinales.*, 17(3), 244-255.
- Rosa, P., Cantrill, V., Benohoud, M., Rayner, C., & Blackburn, R. (2018). Application of Anthocyanins from Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) Fruit Waste as Renewable Hair Dyes. *J. Agric. Food Chem*, 66(26), 6790-6798. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01044>
- Roy, S., & Rhim, J. (2021). Anthocyanin food colorant and its application in pH-responsive color change indicator films. *Food Science and Nutrition*, 61(14), 2297-2325. doi:<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1776211>

- Salinas, Y., García, C., Coutiño, B., & Vidal, V. (2013). Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz. *Revista Fitotecnia mexicana*, 36(3), 285-294.
- Sánchez, G. (2011). Diversidad del Maíz y el Teocintle. Informe preparado para el proyecto: "Recopilación, generación, actualización y análisis de información acerca de la diversidad genética de maíces y sus parientes silvestres en México". *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*.
- Sánchez, R. (2013). La química del color en los alimentos. *Química viva*, 12(3), 234-246.
- Sánchez, W., Cortez, J., Solano, M., & Vidaurre, J. (2015). Cinética de degradación térmica de betacianinas, betaxantinas y vitamina C en una bebida a base de jugo de remolacha (*Beta vulgaris* L.) y miel de abeja. *Scientia Agropecuaria*, 6(2). doi:<http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.02.03>
- Sánchez-Juan, R. (diciembre de 2013). La química del color en los alimentos. *Química Viva*, 3(12), 234-246.
- Sandoval, B., Catalán, U., Fernández, S., & al., e. (2019). Cyanidin-3-glucoside as a possible biomarker of anthocyanin-rich berry intake in body fluids of healthy humans: a systematic review of clinical trials. *Nutrition Reviews*, 78(7), 1-14. doi:10.1093/nutrit/nuz083
- Santini, A., & Novellino, E. (2017). To Nutraceuticals and Back: Rethinking a Concept. *Foods*, 6(9), 74. doi:<https://doi.org/10.3390/foods6090074>
- Santini, A., Tenore, G., & Novellino, E. (2017). Nutraceuticals: A paradigm of proactive medicine. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 96, 53-61. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.09.003>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (27 de diciembre de 2017). *Un buen vino o una buena sidra para despedir el año*. Obtenido de <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/un-buen-vino-o-una-buena-sidra-para-despedir-el-ano>

- Shim, S. H. (2012). Ginkgo biloba extract and bilberry anthocyanins improve visual function in patients with normal tension glaucoma. *Journal of medicinal food*, 15(9), 818-823. doi:<https://doi.org/10.1089/jmf.2012.2241>
- Sierra-Macias, M., Andres-Meza, P., Palafoz-Caballero, A., & Meneses-Marquez, I. (Diciembre de 2016). Diversidad genética, clasificación y distribución racial del maíz nativo en el estado de Puebla, México. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*, 3(9), 12-21.
- Soto-Herrera, J., Castillo-Castañeda, E., & Martínez-Peniche, R. A. (2008). Efecto del nivel de azúcar en la calidad de la efervescencia en sidra espumosa mediante análisis de imágenes. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(1), 33-40.
- Sotomayor, R. (2013). Extracción y cuantificación de antocianinas a partir de los granos de Zea mays. *Ciencia y desarrollo*, 16(1), 69-74.
- Symoneaux, R., Baron, A., Marnetb, N., Bauduinc, R., & Cholletd, S. (2014). Impact of apple procyanidins on sensory perception in model cider (part 1): Polymerisation degree and concentration. *Food science and technology*, 57(1), 22-27. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.016>
- Tarko, T., Duda-Chodak, A., Sroka, P., & Januszek, M. (2020). Effect of Musts Oxygenation at Various Stages of Cider Production on Oenological Parameters, Antioxidant Activity, and Profile of Volatile Cider Compounds. *Biomolecules*, 10(6). doi:<https://doi.org/10.3390/biom10060890>
- Teng, H., Mi, Y., & Cao, H. (2022). Enzymatic acylation of raspberry anthocyanin: Evaluations on its stability and oxidative stress prevention. *Food Chemistry*, 372(15). doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130766>
- Tian Xing, Z., Pramote, P., Siwaporn, P., Sorasak, T., & Ban, C. (2018). Comparison of forage yield, silage fermentative quality, anthocyanin stability, antioxidant activity, and in vitro rumen fermentation of anthocyanin-rich purple corn (*Zea mays* L.) stover and sticky corn stover. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(9), 2082-2095. doi: 10.1016/S2095-3119(18)61970-7

- Ugalde, C., Liu, Z., Ren, C., Chan, K., Rodrigo, K., Ling, Y., . . . Mallery, S. (2009). Distribution of Anthocyanins Delivered from a Bioadhesive Black Raspberry Gel Following Topical Intraoral Application in Normal Healthy Volunteers. *Pharm Res*, 26(977). doi:<https://doi.org/10.1007/s11095-008-9806-x>
- Villota, V., Bonilla, M., Segura, J., Coba, R., & Hannibal, B. (2019). Colorantes naturales para uso alimenticio. *Ciencia Digital*, 3(24), 88-89.
- Vukoja, J., Pichler, A., & Kopjar, M. (Julio de 2019). Stability of Anthocyanins, Phenolics and Color of Tart Cherry Jams. *Journal Foods*, 8(7), 255. doi:10.3390/foods8070255
- Watson, K. (12 de Julio de 2017). *Medical News Today*. Obtenido de The positive and negative health effects of turmeric: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/318405>
- Weichselbaum, E., Wyness, L., & Stanner, S. (2010). Apple polyphenols and cardiovascular disease – a review of the evidence. *Nutrition Bulletin*, 35(2), 92-101. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2010.01822.x>
- Weston, M., Thu-Phan, M., Arcot, J., & Chandrawati, R. (October de 2020). Anthocyanin-based sensors derived from food waste as an active use-by date indicator for milk. *Food Chemistry*, 326(1). doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127017>
- Yang, P., Yuan, C., Wang, H., & Han, F. (2018). Stability of Anthocyanins and Their Degradation Products from Cabernet Sauvignon Red Wine under Gastrointestinal pH and Temperature Conditions. *Molecules*, 23(2), 354. doi:10.3390/moléculas23020354
- Zhang, L., Wang, W., Yue, X., Wu, G., Yue, P., & Gao, X. (22 de noviembre de 2019). Gallic acid as a copigment enhance anthocyanin stabilities and color characteristics in blueberry juice. *Journal Food Sci technology*. doi:<https://doi.org/10.1007/s13197-019-04175-w>

Zhao, C., Yu, Y., Chen, Z., Wen, G., Wei, F., Zheng, Q., . . . Xiao, X. (2017). Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. *Food Chemistry*, 214(1), 119-128. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.073>