



**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias e Ingeniería**

**Evaluación de métodos no térmicos sobre la estabilidad de las antocianinas del maíz morado (*Zea Mays L.*) frente a temperatura de pasteurización.**

**Natalia Blanco y Rafaella Troya**

**Javier Garrido, MSc, Director de Tesis**  
**Mario Caviedes, Ph.D, Director de Tesis**

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Alimentos.

Quito, 19 de diciembre del 2014

**Universidad San Francisco de Quito**

**Colegio de Ciencias e Ingeniería**

**Evaluación de métodos no térmicos sobre la estabilidad de las antocianinas del  
maíz morado (*Zea Mays L.*) frente a temperatura de pasteurización.**

**Natalia Blanco  
Rafaella Troya**

**Javier Garrido, MSc  
Director de Tesis  
Director del Área**

---

**Mario Caviedes, Ph.D  
Director de Tesis**

---

**Lucía Ramírez, Ph.D  
Miembro de Comité de Tesis**

---

**Francisco Carvajal, Ph.D  
Miembro de Comité de Tesis**

---

**Ximena Córdova, Ph.D  
Decano Escuela de Ingenierías  
Colegio de Ciencias e Ingenierías**

---

Quito, diciembre del 2014

**© Derechos de autor**

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

---

Natalia Blanco Leyva  
171469689-3

---

Rafaella Troya Miller  
171257788-9

Quito, 19 de diciembre del 2014

## DEDICATORIA

Sabemos que el sacrificio y la constancia para concluir nuestros estudios no solo se deben a nuestro esfuerzo, también a esas personas que con su apoyo nos motivaron a que lográramos terminar otra etapa más en nuestra vida. Gracias a esas personas importantes, que siempre estuvieron listas para brindarnos toda su ayuda, ahora nos toca regresar un poquito de todo lo inmenso que nos han otorgado. Con todo nuestro cariño esta tesis se las dedicamos a ustedes:

Natalia

Álvaro Blanco

Magdalena Leyva

Felipe Blanco

Nicole

Rafael Troya

Marilyn Miller

Soledad Troya

María Rosa Troya

Sebastián Troya

## **AGRADECIMIENTOS**

Un agradecimiento especial a los profesores Javier Garrido y Mario Caviedes por la orientación brindada y el apoyo a lo largo de nuestra formación académica para así finalizar con este trabajo. En general a todas aquellas personas que nos compartieron cualquier tipo de conocimiento que ha logrado formar no solo profesionales sino personas con una visión más humanista hacia la vida.

## RESUMEN

El presente estudio tuvo como fin el analizar la estabilidad de antocianinas utilizando diferentes moléculas. Se utilizó una variedad ecuatoriana de maíz morado y de esta se extrajeron las antocianinas con una solución etanólica al 20% y un proceso de destilación para luego ser mezcladas con azúcares, iones o aminoácidos en diferentes concentraciones y someterlas a un proceso de pasteurización rápida. En cuanto a los azúcares se observó que la fructosa no tiene ningun efecto estabilizante, mientras la sacarosa al 10% y 15% no mejora ni tampoco afectaba la estabilidad de los pigmentos. En cuanto a los iones, el hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en una concentración de 0,025M no estabiliza a las antocianinas siendo estadísticamente iguales que el blanco. Por último, los aminoácidos treonina y metionina en una concentración al 0,4% presentan un realce en el color de los extractos debido a una reacción conocida como copigmentación. Como conclusion, ninguno de los aditivos mejora notablemente la estabilidad de los pigmentos frente a la temperatura de pasteurización.

## ABSTRACT

The present study was intended to analyze the stability of anthocyanins using different molecules. The anthocyanins were extracted from Ecuadorian purple maize using a 20% ethanol solution and a process of distillation, the pigments were then mixed with sugar, ions, and aminoacids at different concentrations and submitted to a process of fast pasteurization (HTST). Based on sugar results, it was observed that fructose had no stabilizing effect, while 10% and 15% sucrose did not improve or affect the stability of the pigments. Whereas, for the metallic ions, it was noted that using concentrations of 0,025M for iron ( $\text{Fe}^{3+}$ ) and calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) the loss of anthocyanins was the same as the treatment with no metallic ion. The aminoacids metionine and treonine demonstrated that using concentrations of 0,4% had an enhancement of color due to a reaction called copigmentation. As a conclusion, it is noted that none of the aditives used improved notably the stability of the pigments when they were heated at temperatures of pasteurization.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>Dedicatoria</b> .....	5
<b>Agradecimientos</b> .....	6
<b>Resumen</b> .....	7
<b>Abstract</b> .....	8
<b>Lista de Figuras</b> .....	11
<b>lista de Tablas</b> .....	11
<b>Lista de Gráficos</b> .....	12
<b>Lista de Fotografías</b> .....	12
<b>I. introducción</b> .....	13
<b>II. Objetivos</b> .....	15
2.1    Objetivo General .....	15
2.2    Objetivos Específicos .....	15
2.3    Hipótesis.....	15
<b>III. Revisión de literatura / fundamentos teóricos</b> .....	15
<b>3.1    Maíz Morado</b> .....	15
Maíz morado en el Perú .....	16
Maíz morado en el Ecuador .....	18
Usos del maíz morado .....	18
<b>3.2    Antocianinas</b> .....	21
Presencia en la naturaleza .....	21
Estructura Química.....	22
Distribución de las Antocianinas.....	23
Beneficios de las Antocianinas .....	24
Usos de las Antocianinas.....	25
Estabilidad de las Antocianinas.....	28
Estabilización de las antocianinas .....	32
Copigmentación .....	34
Antocianinas del maíz morado .....	35
<b>3.3    Azúcares</b> .....	37
Sacarosa.....	39
Fructosa .....	39
<b>3.4    Iones Metálicos</b> .....	40
Sulfato Ferroso .....	42
Fosfato de Calcio.....	42
<b>3.5    Aminoácidos</b> .....	42

Metionina .....	43
Treonina .....	44
<b>IV. Metodología.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Obtención Materia Prima.....</b>	<b>45</b>
<b>4.2 Secado de maíz.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3 Extracción de las Antocianinas .....</b>	<b>46</b>
<b>4.4 Destilación del etanol y aislamiento de las antocianinas .....</b>	<b>46</b>
<b>4.5 Cuantificación antocianinas .....</b>	<b>46</b>
<b>4.6 Pasteurización de las muestras.....</b>	<b>47</b>
<b>4.7 Medición del pH (pH: (Método 14.022 AOAC, Potenciómetro) .....</b>	<b>47</b>
<b>4.8 Moléculas utilizadas para la estabilización .....</b>	<b>48</b>
<b>4.9 Diseño Experimental .....</b>	<b>48</b>
<b>V. Resultados y discusión.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1 Cuantificación de antocianinas de tres variedades de maíz .....</b>	<b>49</b>
<b>5.2 Cuantificación y análisis de las antocianinas del maíz morado usando diferentes azúcares a diferentes concentraciones .....</b>	<b>52</b>
<b>5.3 Cuantificación y análisis de las antocianinas del maíz morado usando sulfato ferroso y fosfato de calcio a diferentes concentraciones. ....</b>	<b>57</b>
<b>5.4 Cuantificación y análisis de las antocianinas del maíz morado usando diferentes aminoácidos .....</b>	<b>62</b>
<b>VI. Conclusiones .....</b>	<b>66</b>
<b>VII. Recomendaciones .....</b>	<b>67</b>
<b>VIII. Bibliografía .....</b>	<b>69</b>
<b>IX. Índice .....</b>	<b>78</b>
<b>X. Anexos / apéndices .....</b>	<b>79</b>
<b>Anexo 1. Maíz Morado Como Ingrediente.....</b>	<b>79</b>
<b>Anexo 2. Extracto De Maíz Morado Como Ingrediente .....</b>	<b>80</b>
<b>Anexo 3. Alimentos Que Contienen Antocianinas.....</b>	<b>82</b>
<b>Anexo 4. Resultados Análisis de tres variedades de maíz morado.....</b>	<b>83</b>
<b>Anexo 5. Resultados Análisis Utilizando Diferentes Azúcares.....</b>	<b>85</b>
<b>Anexo 6. Resultados Análisis Utilizando Diferentes Iones Metálicos .....</b>	<b>90</b>
<b>Anexo 7. Resultados Análisis Utilizando Diferentes AminoÁcidos.....</b>	<b>95</b>
<b>Anexo 8. Fotografías .....</b>	<b>99</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE 6 ANTOCIANINAS COMUNES .....	23
FIGURA 2. PRINCIPALES FORMAS DE EQUILIBRIO DE LAS ANTOCIANINAS EN MEDIO ACUOSO .....	28
FIGURA 3 . TABLA DE COLOR L*A*B .....	34
FIGURA 4. INTERACCIONES DE LAS ANTOCIANINAS .....	35
FIGURA 5. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA SACAROSA .....	39
FIGURA 6. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA FRUCTOSA .....	39
FIGURA 7. MOLÉCULA DE METIONINA .....	44
FIGURA 8. MOLÉCULA DE TREONINA.....	44
FIGURA 9. FICHA TÉCNICA FOSFATO DE CALCIO .....	111
FIGURA 10. FICHA TÉCNICA SULFATO FERROSO .....	112
FIGURA 11. FICHA TÉCNICA METIONINA .....	113
FIGURA 12. FICHA TÉCNICA TREONINA .....	114

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1. COLOR Y DISTRIBUCIÓN DE LAS ANTOCIANINAS MÁS COMUNES EN DIVERSAS FRUTAS Y VEGETALES .....	24
TABLA 2 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS PROCEDENTES DE TRES TIPOS DE MAÍZ (MG/G).....	49
TABLA 3 PRUEBA DE DUNCAN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS PROCEDENTES DE TRES TIPOS DE MAÍZ (MG/G) ..	49
TABLA 4 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA PÉRDIDA DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES AZÚCARES DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN (MG/G).....	52
TABLA 5 PRUEBA DE DUNCAN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LAS PÉRDIDAS DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES AZÚCARES DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN (MG/G) .....	52
TABLA 6 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL PH DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES AZÚCARES DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN. ....	55
TABLA 7 PRUEBA DE DUNCAN PARA EL ANÁLISIS DE PH DE LAS ANTOCIANINAS DE MAIZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES AZÚCARES DESPUES DE LA PASTEURIZACIÓN. ....	55
TABLA 8 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LAS PÉRDIDAS DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES IONES DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN (MG/G).....	57
TABLA 9 PRUEBA DE DUNCAN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LAS PÉRDIDAS DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES IONES DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN (MG/G).....	57
TABLA 10 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL PH DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES IONES DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN. ....	59
TABLA 11 PRUEBA DE DUNCAN PARA PH DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADOS CON DIFERENTES IONES DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN. ....	59
TABLA 12 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL “INCREMENTO” DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES AMINOÁCIDOS DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN (MG/G).....	62
TABLA 13 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL PH DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES AMINOÁCIDOS DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN.....	63
TABLA 14 PRUEBA DE DUNCAN PARA PH DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES AMINOÁCIDOS DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN.....	63
TABLA 15 PAISES QUE LISTAN AL MAÍZ MORADO COMO INGREDIENTE .....	79
TABLA 16 CATEGORÍAS QUE LISTAN MAÍZ MORADO COMO INGREDIENTE .....	79
TABLA 17 COMPAÑÍAS QUE LISTAN AL MAÍZ MORADO COMO INGREDIENTE.....	80
TABLA 18 PAÍSES QUE LISTAN AL EXTRACTO DE MAÍZ MORADO COMO INGREDIENTE .....	80
TABLA 19 CATEGORÍAS EN LOS QUE USAN EXTRACTO DE MAÍZ MORADO .....	81
TABLA 20 COMPAÑÍAS QUE UTILIZAN EXTRACTO DE MAÍZ MORADO COMO INGREDIENTE .....	81
TABLA 21 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LAS VARIEDADES A, B Y C DE MAÍZ MORADO. ....	83
TABLA 22 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LAS VARIEDADES A, B Y C DE MAÍZ MORADO. ....	84
TABLA 23 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CUANDO SE LES AÑADE 10, 15 O 20% DE SACAROSA. ....	85
TABLA 24 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CON 10, 15 O 20% DE SACAROSA DESPUÉS DE PASTEURIZAR.....	86
TABLA 25 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CUANDO SE LES AÑADE 10, 15 O 20% DE FRUCTOSA. ....	87

TABLA 26 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CON 10, 15 o 20% DE FRUCTOSA DESPUÉS DE PASTEURIZAR.....	88
TABLA 27 CANTIDAD DE ANTOCIANINAS QUE SE PERDIERON DE LOS EXTRACTOS DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN UTILIZANDO LOS DIFERENTES PORCENTAJES DE SACAROSA O FRUCTOSA.....	89
TABLA 28. VALORES DE PH PARA CADA MUESTRA UTILIZANDO DIFERENTES AZÚCARES .....	89
TABLA 29 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CUANDO SE AÑADEN 0,05M O 0,025M DE SULFATO FERROSO.....	90
TABLA 30 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CON 0,05M O 0,025M DE SULFATO FERROSO DESPUÉS DE SER PASTEURIZADOS.....	91
TABLA 31 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CUANDO SE AÑADEN 0,05M O 0,025M DE FOSFATO DE CALCIO.....	92
TABLA 32 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CON 0,05M O 0,025M DE FOSFATO DE CALCIO DESPUÉS DE SER PASTEURIZADOS.....	93
TABLA 33 CANTIDAD DE ANTOCIANINAS QUE SE PERDIERON DE LOS EXTRACTOS DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN UTILIZANDO LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE IONES DE HIERRO Y DE CALCIO.....	94
TABLA 34 VALORES DE PH PARA CADA MUESTRA UTILIZANDO DIFERENTES IONES METÁLICOS .....	94
TABLA 35 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CON 0,4% DE METIONINA O TREONINA.....	95
TABLA 36 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CON 0,4% DE METIONINA O TREONINA DESPUÉS DE SER PASTEURIZADOS.....	96
TABLA 37 CANTIDAD DE ANTOCIANINAS QUE SE PERDIERON DE LOS EXTRACTOS DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN UTILIZANDO METIONINA Y TREONINA.....	97
TABLA 38 VALORES OBTENIDOS DE ANTOCIANINAS CON EL USO DE METIONINA.....	97
TABLA 39 VALORES OBTENIDOS DE ANTOCIANINAS CON EL USO DE TREONINA .....	97
TABLA 40 VALORES DE PH PARA CADA MUESTRA UTILIZANDO DIFERENTES AMINO ÁCIDOS.....	98

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. MERCADOS DE DESTINO DE MAÍZ MORADO Y SUS DERIVADOS 2006 (EN TM).....	17
GRÁFICO 2. EXPORTACIÓN GLOBAL DEL MAÍZ MORADO (2012) .....	18
GRÁFICO 3. CATEGORÍAS DE ALIMENTOS QUE LISTAN MAÍZ MORADO COMO PARTE DE SUS INGREDIENTES .....	19
GRÁFICO 4. CATEGORÍAS DE ALIMENTOS QUE LISTAN AL EXTRACTO DE MAÍZ MORADO COMO INGREDIENTE... ..	20

## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA 1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE ANTOCIANINAS .....	99
FOTOGRAFÍA 2 CUANTIFICACIÓN ANTOCIANINAS DE LAS TRES VARIEDADES DE MAÍZ MORADO .....	100
FOTOGRAFÍA 3 EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PH 2.....	100
FOTOGRAFÍA 4 PASTEURIZACION DEL EXTRACTO DE ANTOCIANINAS A PH 2 .....	101
FOTOGRAFÍA 5 DESTILACIÓN DE ETANOL DEL EXTRACTO DE ANTOCIANINAS.....	101
FOTOGRAFÍA 6 PASTEURIZACION DE LOS EXTRACTOS DE ANTOCIANINAS .....	102
FOTOGRAFÍA 7 EXTRACTOS DESPUES DE LA PASTEURIZACION RAPIDA (STHT).....	104
FOTOGRAFÍA 8 EFECTOS DE LA ADICIÓN DE DIVERSAS MOLÉCULAS EN LOS EXTRACTOS DE ANTOCIANINAS..	104
FOTOGRAFÍA 9 DIVERSAS CONCENTRACIONES DE IONES EN LOS EXTRACTOS DE ANTOCIANINAS.....	105
FOTOGRAFÍA 10 DIVERSAS CONCENTRACIONES DE IONES EN LOS EXTRACTOS DE ANTOCIANINAS.....	105
FOTOGRAFÍA 11 ADICIÓN DEL CALCIO EN CONCENTRACIONES DE 0,025 Y 0,05M .....	106
FOTOGRAFÍA 12 ADICIÓN DEL HIERRO EN CONCENTRACIONES DE 0,025 Y 0,05M .....	106
FOTOGRAFÍA 13 DIFERENCIA DE COLOR DE LOS EXTRACTOS CON HIERRO, CALCIO Y EL BLANCO .....	107
FOTOGRAFÍA 14 DIVERSAS CONCENTRACIONES DE AZÚCARES EN LOS EXTRACTOS.....	107
FOTOGRAFÍA 15 10% DE AZÚCARES EN LOS EXTRACTOS DE ANTOCIANINAS.....	108
FOTOGRAFÍA 16 15% DE AZÚCARES EN LOS EXTRACTOS DE ANTOCIANINAS.....	108
FOTOGRAFÍA 17 20% DE AZÚCARES EN LOS EXTRACTOS DE ANTOCIANINAS.....	109
FOTOGRAFÍA 18 CONCENTRACIONES MÁS ALTAS DE LAS MOLÉCULAS Y BLANCO.....	109
FOTOGRAFÍA 19 TRATAMIENTO DE HIERRO EL MÁS PERJUDICIAL EN LA ESTABILIDAD DE ANTOCIANINAS Y EL DE METIONINA EL MEJOR PARA LA ESTABILIDAD DE LOS PIGMENTOS FRENTE A LA PASTEURIZACIÓN. ....	110
FOTOGRAFÍA 20 AMINOACIDOS METIONINA Y TREONINA COMPARADOS CON HIERRO 0,05M .....	110

## I. INTRODUCCIÓN

El problema de la baja demanda nacional de los cultivos de maíz morado, puede ser atribuido en parte, al desconocimiento de la composición química, sus propiedades nutritivas y funcionales. A pesar del gran valor nutricional que presenta el grano de maíz morado (*Zea mays L.*), su presencia comercial en los mercados es limitada y su frecuencia de consumo ha disminuido considerablemente en la población. Por lo que esta investigación, busca proporcionar algunas razones por las cuales se debería considerar el aumentar la producción de este maíz en el Ecuador y en un futuro ser usado en la fabricación de diversos productos alimenticios (Mayorga, 2010). La presencia de antocianinas en las variedades pigmentadas del maíz, le hace un producto potencial para el suministro de colorantes y antioxidantes naturales. Por esto, el estudio de los pigmentos del maíz morado (*Zea mays L.*) ha despertado un interés en la industria de alimentos, que conlleva a utilizarlo como materia prima para la elaboración de productos con valor agregado. Sin embargo, se dispone de información limitada sobre la estabilidad de las mismas (Acevedo, 2003).

Las antocianinas son los flavonoides más abundantes que influyen en el color de diversas plantas, sin embargo, el color es secundario cuando se habla de sus funciones antioxidantes. Es por este motivo, que se las ha utilizado en alimentos y bebidas tanto como colorantes naturales y como antioxidantes; sin embargo, existe una barrera para usarlas y es debido a su gran inestabilidad. Muchos factores intervienen en dicha estabilidad como: acilación, glucuronidación con enzimas, auto asociación, copigmentación, temperatura, oxígeno y otros (Tachibana et al., 2013). Las antocianinas son estables en condiciones ácidas (pH 2). Cuando no están dentro de esta condición se transforman en compuestos incoloros y pigmentos cafés insolubles. Muchos estudios han

sido realizados para mejorar la estabilidad de las antocianinas con la adición de diferentes aditivos como: ácidos, azúcares, sales, hidrocoloides y diferentes compuestos fenólicos (Kopjar y Pilizota, 2010). Si se logra incrementar la estabilidad de las antocianinas su valor y su uso se expandirá.

Existe una gran controversia acerca del uso de azúcares, iones y otras moléculas sobre su efectividad para mejorar la estabilidad de las antocianinas, es por esto, que se realizó este estudio con el fin de obtener mayor información sobre el comportamiento de las antocianinas del maíz morado. Debido a que las antioxidantes han llamado tanto la atención en estos últimos años, se podrá utilizar la información recopilada en este estudio para poder aplicarlo a productos elaborados con maíz morado y también en la contribución general que podrían tener estos pigmentos en ciertos complejos alimenticios. Con este estudio se espera dar continuidad a las investigaciones acerca de las interacciones que tienen las antocianinas con diversas moléculas y como estas pueden ayudar o por el contrario perjudicar su estabilidad, color y aún más importante su actividad antioxidante. Es por esto, que se quiere determinar el comportamiento de las antocianinas del maíz morado frente a temperaturas de pasteurización cuando se adicionan ya sea azúcares, iones o aminoácidos.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

- Determinar si la adición de aminoácidos, azúcares e iones metálicos contribuyen a la estabilidad de extractos de antocianinas del maíz morado cuando son expuestos a la pasteurización.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Establecer un proceso de extracción de antocianinas.
- Cuantificar el contenido de antocianinas en dos variedades de maíz morado procedentes del Ecuador.
- Cuantificar el contenido de antocianinas y su pH antes de la adición de diversas moléculas para luego ser sometidos a una pasteurización rápida.

### **2.3 HIPÓTESIS**

Al utilizar diversas moléculas en los extractos de antocianinas se logra estabilizar a los pigmentos cuando estos son sometidos a temperaturas de pasteurización.

## **III. REVISIÓN DE LITERATURA / FUNDAMENTOS TEÓRICOS**

### **3.1 MAÍZ MORADO**

El maíz es originario de América entre los 3000 y 2500 años a.C.; en la primera civilización del Perú, Caral, ya tenía este recurso muy bien explotado. Pero tomó importancia hace 2250 años en donde se preparaba la chicha para las ceremonias. En la época prehispánica fue conocido como oro, sara o kullisara. En el Perú debido a las diversas zonas de cultivo se permite tener muchas variedades de maíz hoy en día. Es así como aparece el maíz morado, esta variedad es cultivada en la Cordillera de Los Andes del

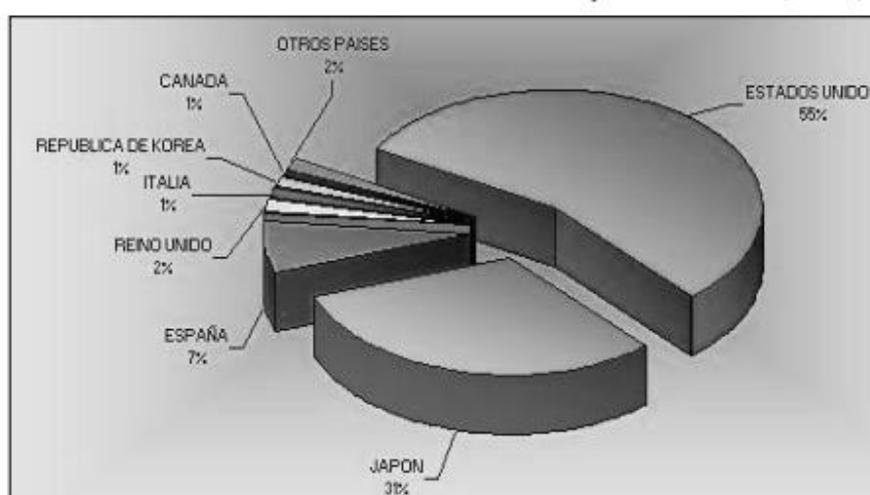
Perú y Bolivia, tiene un color morado oscuro e intenso y lo curioso es que si se siembra en otro lugar (que no estén entre los 2200 o 2800 msnm) el color cambia, incluso podría salir amarillo, esto se debe a las altitudes en las cuales se siembra pues ve afectado por el nivel de oxígeno (Silva, 2008). En el Perú existen muchas variedades de maíz morado como: Morado Canteño, Morado Mejorado, Morado Caraz, Arequipeño, Cuzco Morado y Negro Junín. Sin embargo, la variedad más comercial es el maíz morado Canteño. Este maíz contiene el pigmento denominado antocianina - cianidina -  $3\beta$  - glucosa, que se encuentra en mayor cantidad en la coronta (tusa) y en menor proporción en el pericarpio (cáscara) del grano, el maíz está constituido en un 85% por grano y 15% por coronta. La cianidina es una antocianina que a la vez es un antioxidante lo cual ha despertado el interés para usar esta materia prima en productos elaborados. Además de este antioxidante presente en el maíz también se destaca el contenido de carbohidratos y proteínas. La coronta tiene una importante fracción de fibra, carbohidratos y minerales. En relación a los minerales del grano, su contenido de fósforo y calcio es importante. Una gran ventaja del maíz morado es que se adapta tanto a climas de costa como de sierra, según la variedad; sin embargo, las condiciones óptimas para la producción del maíz son los suelos profundos de textura franca a franco-arcillosa, que retienen humedad (Solid Perú, 2007).

#### MAÍZ MORADO EN EL PERÚ

Desde 1993 el Perú exporta maíz morado a Estados Unidos y Japón para fines industriales y en menor escala a Francia, Inglaterra, España, Bélgica y Venezuela. Los principales mercados de destino del maíz morado entero y sus diferentes presentaciones en 2006 fueron: EEUU (hacia donde se dirigen el 55% del volumen de exportaciones) y Japón (que capta el 31% del total de exportaciones, principalmente de coronta) (Solid Perú, 2007). Perú es un muy fuerte productor pero también tiene competencia de Bolivia, China, Brasil,

México, Francia, Yugoslavia, Rumania, Italia, Sudáfrica, Argentina y Chile, cuya materia prima es utilizada generalmente para la producción de colorantes sintéticos. Aunque China tiene una producción importante de maíz morado, este tiene menor concentración de pigmento que el peruano (Sierra exportadora, 2013). Es muy vendido en el exterior donde el mayor comprador es Estados Unidos debido a que la antocianina es muy valorada en el exterior, donde es procesada para medicinas.

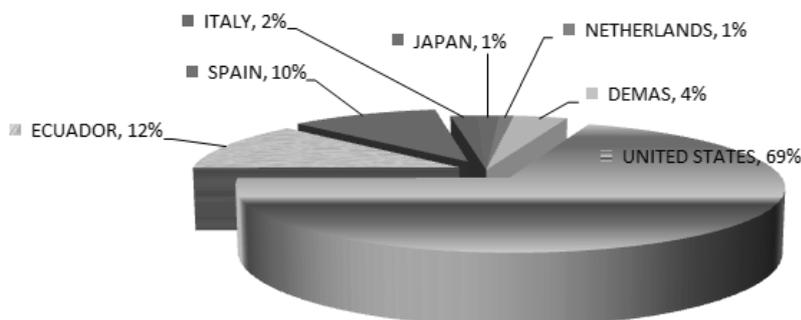
**GRÁFICO 1. MERCADOS DE DESTINO DE MAIZ MORADO Y SUS DERIVADOS 2006 (EN TM)**



**FUENTE: SOLID PERÚ, 2006**

En el año 2012, las exportaciones alcanzaron un promedio mensual de US\$ 65,674, lo que significó un incremento del 35%, respecto del 2011 (US\$ 48,695). El principal país de destino fue Estados Unidos con US\$ 546 mil (69% del total), seguido por Ecuador con US\$ 97 mil (12%) y España US\$ 81 mil (10%) (Yaipén, 2013).

GRÁFICO 2. EXPORTACIÓN GLOBAL DEL MAÍZ MORADO (2012)



FUENTE: SOLID PERÚ, 2012

### MAÍZ MORADO EN EL ECUADOR

En el Ecuador el maíz morado se cultiva en el callejón Interandino entre los 2200 y 2800 msnm. Por lo general la mayoría de los productores siembran desde septiembre hasta mediados de enero, coincidiendo la siembra con el inicio del período de lluvias, obteniendo de esta manera un mayor grado de germinación y producción (INIAP, 2011). A pesar del gran valor nutricional que presenta la raza de maíz “Racimo de uva”, su presencia comercial en los mercados es limitada y su frecuencia de consumo ha disminuido considerablemente en la población, siendo necesario caracterizarlo para rescatar su valor nutricional (Mayorga, 2010). Se puede impulsar la producción de este producto al darse a conocer lo valioso que es y empezar a incrementar la producción en el Ecuador.

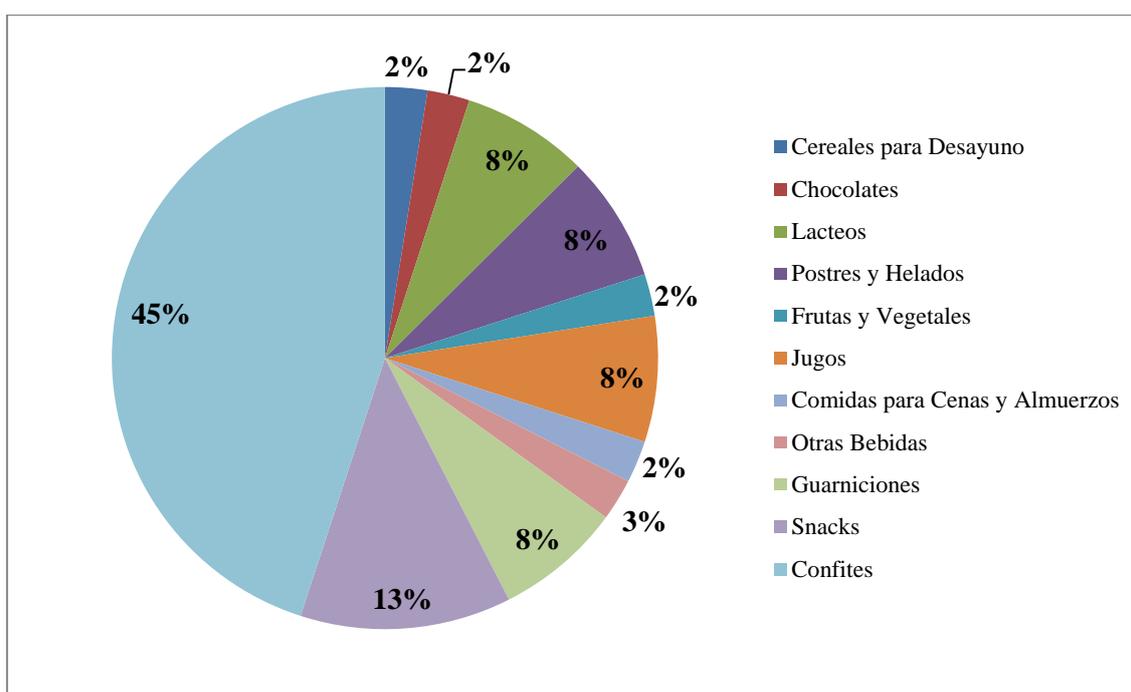
### USOS DEL MAÍZ MORADO

El maíz morado es usado a nivel casero como colorante natural para la “mazamorra morada” y la “chicha”. A nivel industrial se usa para obtener colorante de la coronta (Raquis), debido a su contenido de antocianinas. Dicho pigmento es usado a nivel industrial como insumo para la coloración de bebidas, productos lácteos, productos de panadería, productos vegetales, conservas de pescado, grasas, aceites, mermeladas, jaleas, frutas confitadas, frutas en almíbar, jarabes de frutas, sopas, almíbar; también se usa para

teñir tejidos y en la industria de cosméticos. El grano se puede aprovechar para la extracción de almidones y/o derivados o en la elaboración de alimentos balanceados para animales (Mayorga, 2010).

El maíz morado ha generado su popularidad en diversos países, ya sea por sus propiedades benéficas y también por su interés como colorante. Según la base de datos de Mintel (2014) los países que listan al maíz morado como parte de sus ingredientes son Japón, Estados Unidos, China, Perú y Venezuela {Anexo 1}. En el Gráfico 3 se puede observar un análisis de las categorías de productos alimenticios que contienen maíz morado como ingrediente; se denota que la industria de confites para caramelos y goma de mascar es la que más utiliza al maíz morado como ingrediente, siguiéndolo la industria de los bocadillos (Mintel, 2014). La empresa Japonés Furuta {Anexo 2} se dedica a la fabricación de chocolates y caramelos, son quienes utilizan en mayor cantidad el maíz morado en comparación con el resto de las marcas.

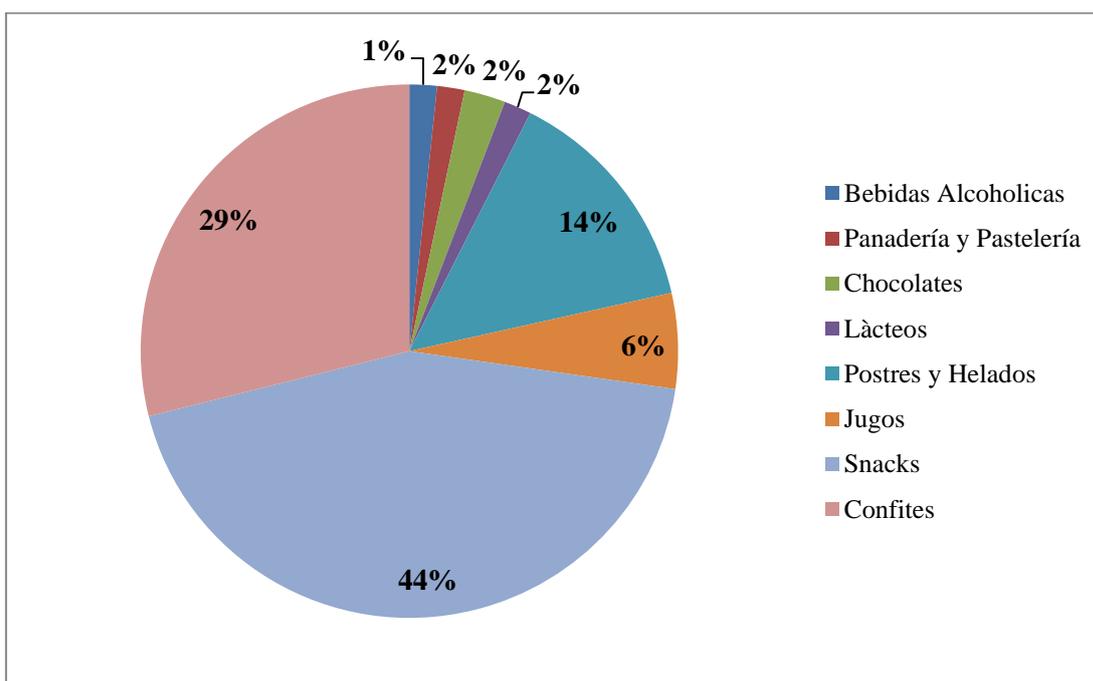
**GRÁFICO 3. CATEGORÍAS DE ALIMENTOS QUE LISTAN MAÍZ MORADO COMO PARTE DE SUS INGREDIENTES**



FUENTE: MINTEL, 2014

Aparte de listar al maíz morado como ingrediente, existen muchos países que utilizan el extracto del maíz morado como parte de sus productos. Es importante denotar que según la base de datos Mintel, el extracto del maíz morado es considerado un colorante natural o la antocianina. Japón contiene la mayor cantidad de variantes que utilizan este extracto tomando casi 92% del mercado {Anexo 3}, en donde su mayor uso va destinado para snacks (Mintel, 2014). En este caso, la empresa Japonesa quien utiliza mayor cantidad de este ingrediente es Koikeya; que se dedica al uso del extracto para elaborar bocadillos salados como papas fritas, productos extruidos y canguil (Koikeya, 2014).

**GRÁFICO 4. CATEGORÍAS DE ALIMENTOS QUE LISTAN AL EXTRACTO DE MAÍZ MORADO COMO INGREDIENTE**



FUENTE: MINTEL, 2014

En el Ecuador existen diversas variedades de maíz, los hay amarillos brillantes, amarillos pálidos, blancos mate, blancos brillantes, negros, negros azulados, morados, azules pálidos, rojos resplandecientes, anaranjados. Y, por supuesto, los hay que combinan dos o más

colores en una sola mazorca (Carrera, 2012). Sin embargo, existe un gran interés en el maíz morado debido a la presencia del pigmento que le atribuye dicho color. Este es llamado antocianina, un flavonoide o antioxidante, que previene la muerte de tejidos que usualmente ocasionan cáncer y enfermedades relacionadas con el envejecimiento o decaimiento degenerativo (Causse, 2010). El maíz morado es rico en fitoquímicos, principalmente compuestos fenólicos y antocianinas, y como es mencionado antes la cianidina-3- $\beta$ -glucósido su pigmento mayoritario. Estas poseen conocidas propiedades farmacológicas, nutraceúticas y efectos benéficos para la salud humana (Cuevas et al., 2008).

### **3.2 ANTOCIANINAS**

#### PRESENCIA EN LA NATURALEZA

Las antocianinas son el grupo más importante de pigmentos flavonoides de plantas que son solubles en agua y visibles para el ojo humano (Strack y Wray, 1994). Su nombre proviene de la palabra griega *anthos* que significa flores y *kyanos* que significa azul oscuro (Horbowicz et al., 2008). Las antocianinas constituyen una subclase de flavonoides, y son responsables de las coloraciones rojiza y azulada encontradas en plantas (Wrolstad, 2004). Las antocianinas son un grupo importante y extenso de pigmentos, las cuales aunque la mayoría claramente vistas en flores y frutas, pueden ser también encontradas en la epidermis de las hojas (Delpech, 2000). Se han reportado que existen más de 200 antocianinas presentes en la naturaleza (Mazza y Miniati, 1993). Sin embargo, el enfoque de estudio ha sido en 17 de ellas donde cada una se diferencia por diversas características en su estructura y composición (Wu et al., 2006).

## ESTRUCTURA QUÍMICA

Las antocianinas son derivados del benzopirilio 2- fenil con dos anillos benzoilo (A y B) y un anillo cíclico (C) como se puede observar en la Figura 1. Estos son compuestos de una aglicona, o también llamado antocianidina, junto con un azúcar. En el caso de ser una antocianina acilada, esta se puede unir a un ácido orgánico (Shipp y Abdel-Aal, 2010). Dentro de su estructura, la variación se da en las diferentes posiciones de los grupos hidroxilo y metoxilo y el tipo de azúcar así como la posición en la que se encuentra dentro de los anillos de las antocianinas. Por parte de su composición, estas se diferencian en el grado que existe acilación del azúcar y también el agente acilante que utiliza (Prior, 2004). Dentro de las antocianidinas más comunes, existen seis que están distribuidos de forma ubicua en la mayoría de las plantas y frutas y que tienen gran importancia en la dieta de los humanos, éstas son; Cianidina (Cy), Delfinidina (Dp), Petunidina (Pt), Peonidina (Pn), Pelargonidina (Pg) y Malvidina (My) (Wu et al., 2006). La cianidina, petunidina y pelargonidina son las tres antocianidinas más abundantes en la naturaleza; estas corresponden al 80% de los pigmentos de las hojas, 69% de los pigmentos de las frutas y el 80% de los pigmentos de las flores (Gosh y Konishi, 2007).

FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE 6 ANTOCIANINAS COMUNES

Antocianina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Cianidina (Cy)	H	OH	H
Delfinidina (Dp)	OH	OH	H
Malvidina (My)	OH	OH	OH
Pelargonidina (Pg)	OMe	OH	H
Peonidina (Pn)	OMe	OH	OH
Petunidina (Pt)	OMe	OH	OMe

FUENTE: WAO ET AL., 2006

## DISTRIBUCIÓN DE LAS ANTOCIANINAS

Las antocianinas son antioxidantes abundantes en la naturaleza, presentes especialmente en frutas y vegetales. Wao et al. (2006) presentaron una tabla {Anexo 3} en la que demuestran todos los alimentos en los que están presentes las antocianinas.

En base al Anexo 3, se puede comprobar que la presencia es profusa en la naturaleza y cada una da una coloración diferente, esto se da debido a las posiciones de sus compuestos químicos (Miguel, 2006). A medida que la antocianina contiene más grupos OH en su anillo benzoilo (B), su coloración va a ser más azulada (Delgado y Paredes, 2003). Según Miguel (2011) se puede diversificar que las coloraciones para cada antocianina pueden variar, dando la amplia gama de colores en la naturaleza. La cianidina y la peonidina generan una coloración naranja a roja, la delfinidina, petunidina y malvidina generan una coloración azul a roja y por último la pelargonidina da un color naranja. Estos compuestos

pueden estar presentes en diversas frutas y vegetales, usualmente en una mezcla de varias antocianinas, sin embargo suele siempre predominar una.

**TABLA 1. COLOR Y DISTRIBUCIÓN DE LAS ANTOCIANINAS MÁS COMUNES EN DIVERSAS FRUTAS Y VEGETALES**

<b>Compuesto</b>	<b>Color</b>	<b>Fruta y Vegetal</b>
Cianidina	Naranja a rojo	Mora, fresas, grosella negra, cereza, col morada, arándanos, uva, ciruelas, frambuesas, cebolla paiteña, maíz morado
Delfinidina	Azul a rojo	Mortiño, uva
Malvidina	Azul a rojo	Mortiño, uva
Petunidina	Rojo	Fresa, uva
Pelargonidina	Naranja	Fresas, maíz
Peonidina	Rojo	Cereza, arándano, camote, ciruelas

FUENTE: ANTAL ET AL, 2003 Y WANG, 1997

#### BENEFICIOS DE LAS ANTOCIANINAS

Estos flavonoides se han convertido en compuestos muy populares por sus propiedades benéficas para salud humana. Por siglos, las antocianinas han sido incorporadas en la dieta de los humanos para ser usados como medicinas naturales tales como la hipertensión ya que evita la formación de la placa de ateroma, uniéndose con el colesterol malo (LDL), disentería debido a sus propiedades antiinflamatorias, problemas con el colesterol, cáncer evitado la proliferación de células dañinas, entre otras enfermedades (Konczak y Zhang, 2004). Sirven como mecanismo de control para la diabetes tipo II y la obesidad, ya que inhibe enzimas digestivas como por ejemplo la  $\alpha$ -glucosidasa,  $\alpha$ -amilasa, proteasas y lipasas (Droge, 2002). Ayudan en las actividades anti inflamatorias, de desintoxicación, antiproliferas, antiangiogénicas e inducciones de apoptosis (Nikkhah et al., 2008). También ayudan a retardar enfermedades que vienen con el envejecimiento como el Alzheimer

(Miguel, 2006). Su principal función dentro del cuerpo humano es su actividad antioxidante. Los radicales libres tienen ciertas funciones positivas en el cuerpo humano, tales como la señalización de procesos en las células. La señalización de procesos se da mediante radicales libres como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS); sin embargo cuando existe un exceso de estas dos especies y la capacidad antioxidante endógena es superada, se da una reacción oxidativa dentro del cuerpo. Esta reacción crea daños en las enzimas, proteínas, lípidos y especialmente en el ADN del cuerpo humano generando mutaciones o proliferaciones que suelen llevar a enfermedades crónicas degenerativas tales como enfermedades coronarias, envejecimiento y el cáncer (Dai y Mumper, 2010). Los antioxidantes son compuestos que retardan, inhiben o previenen la oxidación de los radicales libres. Estos pueden actuar en cuatro distintos niveles; (a) prevenir una iniciación encontrando especies ROS y RNS, (b) bajar concentraciones locales de oxígeno (c) descomposición de los peróxidos para convertirlos a compuestos que no son radicales libres tales como el alcohol y (d) o formar complejos con metales para evitar especies reactivas (Miguel, 2006; Dai y Mumper, 2010). Sin embargo, es importante recalcar que la actividad antioxidante se ve influenciada notablemente por la estructura química de la antocianina. Las antocianinas que contengan mayor número de hidroxilos en el anillo pirona va a tener mayor capacidad antioxidante (Kay, 2004).

#### USOS DE LAS ANTOCIANINAS

Los beneficios de las antocianinas han creado una gran popularidad dentro de la industria alimenticia. Estos han sido utilizados como pigmentos naturales, ingredientes alimenticios funcionales y como suplementos dietéticos (Shipp y Abdel-Aal, 2010).

### *ANTOCIANINAS COMO PIGMENTOS NATURALES*

Las antocianinas son consideradas como sustitutos potenciales para los colorantes sintéticos debido a sus colores atractivos brillantes y solubilidad en el agua que permiten su incorporación a sistemas alimenticios acuosos también como posibles beneficios en la salud debido a su actividad antioxidante (Mazza y Miniati, 1993). A las antocianinas se les ha sugerido en el uso de bebidas, gelatinas, mermeladas, helados, yogur, postres de gelatina, frutas enlatadas, salsa de frutas, dulces y confitería, y rellenos para panadería (Francis, 2000). Estos son inestables con los cambios de pH, sin embargo se ha demostrado que la glucosilación y la acilación dan estabilidad a los cambios de pH, calor y tratamientos con luz. Los vegetales tales como el camote, la zanahoria morada, rábano y col morada han demostrado tener mayor porcentaje de acilación por lo que les hace efectivos para ser utilizados como colorantes estables (Stintzing y Carle, 2004). A un pH 3.5 la pelargonidina presente en el rábano ha demostrado tener un color rojo similar al Rojo Allura (Federal Food Drug and Cosmetic Red No. 40) (Stintzin et al., 2002); sin embargo, su efecto fue óptimo cuando se bajaron drásticamente las concentraciones de aroma y sabor (Shipp y Abdel-Aal, 2010). El Arroz Rojo es utilizado como pigmentos en China para productos de carne, pesca y soya (Ma et al., 2000). Giusti y Wrolstad (2003) descubrieron que las antocianinas extraídas del rábano, de la col morada, la zanahoria negra y la cáscara de la uva son ideales para pigmentar productos lácteos como el yogurt y crema agria. Se determinó que por su vida útil corta y el almacenamiento en refrigeración, no existió una degradación rápida en la coloración y pudo usarse una pequeña muestra de hasta 5 mg de antocianina monomérica por cada 100 gramos de muestra.

### *ANTOCIANINAS COMO INGREDIENTES ALIMENTICIOS FUNCIONALES*

El consumo de antocianinas por los humanos ha ido incrementando con el pasar de los años ya que existe mayor conocimiento sobre sus beneficios. Su uso es preferible en alimentos con un pH ácido para no perder su color. Por ejemplo, se utiliza pigmentos de la uva para la industria de bebidas en cantidades de alrededor de 3 kg de extracto al 1% de antocianinas para 1000 litros de bebida y dan una coloración morada oscura (Bridle y Timberlake, 1996). El sorgo negro también es utilizado como un buen alimento funcional debido a que contiene aproximadamente 4.0-9.8 mg/g de antocianina en su salvado (Awika et al., 2004). Dependiendo del país y de los hábitos nutricionales de los individuos, la ingesta diaria de antocianinas ha sido estimada en el rango de varios miligramos a cientos de miligramos por persona (Horbowicz et al., 2008). La FDA (Food and Drugs Administration) recomienda un consumo diario de antioxidantes de 3000 a 5000 unidades ORAC (o moles de TE/100g) al día. El método ORAC mide la habilidad de los polifenoles para atrapar los radicales peróxilos generados in situ y es la técnica más usada para medir el potencial antioxidante total de alimentos y suplementos nutricionales (Zapata et al., 2013).

### *ANTOCIANINAS COMO SUPLEMENTO DIETÉTICO*

Los extractos ricos en antocianinas han sido desarrollado e incorporados en suplementos dietéticos. Un ejemplo es Medox y contienen principalmente cianidina 3-glucósido y delfinidina 3-glucósido extraído de ciertas bayas y grosellas; donde es utilizado para tratamientos de dermatológicos y de la piel con una presentación en capsulas de 80 mg de antocianina concentrada (Awika et al., 2004). También se venden Cholestin, que son antocianinas del arroz rojo y son vendidas con el propósito de bajar el colesterol (Shipp y Abdel-Aal, 2010).

Los usos de las antocianinas en la industria alimenticia ha crecido debido a sus beneficios, sin embargo estos han estado bajo estudio ya que su inestabilidad frente a factores como pH, luz y temperatura pueden ser altas.

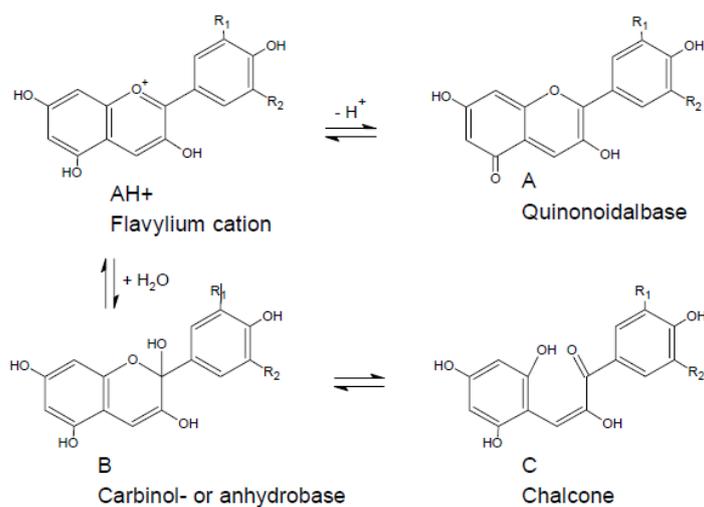
#### ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS

El mayor problema con el uso de las antocianinas como colorantes naturales es su estabilidad. Las antocianinas son estables bajo condiciones ácidas (pH 2), pero bajo condiciones normales de procesamiento y almacenamiento se transforman en compuestos sin color y luego en pigmentos de color café que son insolubles. Un número de factores influyen en la estabilidad de estos pigmentos como pH, temperatura, luz, oxígeno, enzimas, presencia de ácido ascórbico, azúcares, sales, iones metálicos y copigmentos (Kopjar y Pilizota, 2011).

#### *pH*

Las antocianinas tienden a cambiar de color a medida que cambia el pH, sin embargo estas son más estables en medio ácido que básico (Rein, 2005).

**FIGURA 2. PRINCIPALES FORMAS DE EQUILIBRIO DE LAS ANTOCIANINAS EN MEDIO ACUOSO**



FUENTE: REIN, 2005

En base a la Figura 2 se puede observar las cuatro formas principales de equilibrio de las antocianinas. En un medio ácido ( $\text{pH} < 5$ ), el catión flavilio es quien predomina; sin embargo esto cambia a medida que sube el pH. Cuando se incrementa el pH, el catión recibe un ataque nucleofílico generando el carbinol, que es incoloro. Esto se da ya que el carbinol pierde el doble enlace entre el anillo central y el que está localizado a la derecha, y con esto no absorbe luz visible (Brouillard, 1982). Mientras el pH sube, su forma carbinol se va transformando a la chalcona que también es incolora (Mazza y Brouillard, 1987). Si se quiere revertir la forma incolora, se puede bajar el pH; sin embargo, si es que ya se han formado chalconas iónicas inestables entonces no se podrá regresar a un color determinado en la forma de catión flavilio (Brouillard, 1982).

### *LUZ*

La luz es esencial para la biosíntesis de las antocianinas, sin embargo también se ha demostrado que su presencia puede fomentar la degradación (Markakis, 1982). Bebidas carbonatadas de uva demostraron perder alrededor del 30% de las antocianinas al ser almacenadas en la oscuridad, mientras que perdieron el 50% cuando fueron almacenadas en percha normal en un supermercado (Palamidis y Markakis, 1978)

### *ENZIMAS*

Las enzimas generalmente producen daños sobre las antocianinas, es por esta razón, que su inactivación es beneficiosa para la estabilidad de las mismas (Rein, 2005). Las enzimas que tienen mayor impacto sobre estos compuestos son las glucosidasas, fenolasas y peroxidadas (García et al., 2004). El mecanismo por el cual afectan las glucosidasas a las antocianina es porque rompen el enlace entre el residuo glicosil y la aglicona, lo que da

como resultado una antocianidina muy inestable (Rein, 2005). Las fenolasas tienen una reacción similar, sin embargo estas son más acentuadas cuando existe la presencia de diferentes ácidos como tartárico o el catecol, y usualmente están presentes en las frutas en conjunto con las antocianinas (Yokotsuka, 1997). La estructura de las antocianinas influye en cómo interactúan con las enzimas, como ejemplo, se determina que ante la polifenoloxidasas los glucósidos de la malvidina son más estables que aquellos provenientes de la delphinidina (Skrede et al., 2000).

#### OXÍGENO

La presencia de oxígeno fomenta a la degradación cuando estas se someten a calor, pH básicos, luz y presencia de ácido ascórbico (Rein, 2005). Sin embargo, un efecto positivo en su interacción con el oxígeno es cuando las antocianinas trabajan como antioxidantes. Estas reaccionan entre radicales del oxígeno y tienen los efectos benéficos para la salud mencionados anteriormente (García-Alonso et al., 2004).

#### TEMPERATURA

En la industria alimenticia, el tratamiento térmico es un paso necesario hacia la conservación y preservación de los alimentos y se ha visto que durante el procesamiento de frutas en especial la temperatura, es una de los factores con más influencia dentro de la estabilidad de las antocianinas. Es por esto, que se buscan procesos que permitan mejorar la retención del color de los productos en los cuales dentro de su formulación se encuentren estos pigmentos. Ya que es de vital importancia al momento de vender un producto el cómo se lo presenta al cliente para que este al final se decida a comprarlo (Kopjar y Pilizota, 2011).

Las antocianinas tienen menor estabilidad y se vuelven incoloras a medida que sube la temperatura. El primer paso en una degradación térmica se da con la formación de una chalcona (Adam, 1973), esto luego puede dar a un pardeamiento de los productos y se ve el efecto aumentado en presencia de oxígeno (Rein, 2005). Keith y Powers (1965) determinaron que pelargonidina 3-glucósido es más estable a 100°C que la petunidina 3-glucosido y malvidina 3-glucósido. En términos generales, el aumento de la temperatura puede contribuir a la degradación de las antocianinas. La eliminación del oxígeno puede proteger a las antocianinas frente a procesos térmicos.

Existen también efectos positivos de la temperatura a las antocianinas. Sin embargo, estas oscilan en un rango de 0°C a 15°C; se han realizado estudios sobre fresas y frambuesas, donde se encontró que a los ocho días de almacenamiento aumentaron su concentración de antocianinas (Kalt et al., 1999). Estudios realizados sobre arándano, demostraron que el almacenamiento por tres meses a una temperatura de 15°C aumentó la concentración de antocianinas (Wang y Stretch, 2001).

El valor D es un parámetro cinético, que corresponde al tiempo que se necesita para una reducción decimal de una concentración inicial de una sustancia o un reactante a una temperatura constante. Para las antocianinas en el rango de 70 °C hasta 90 °C se calculó valores D altos, pero que van descendiendo a medida que aumenta la temperatura, lo que significa que existe una lenta degradación de los pigmentos. Llegando a los 95 °C el valor D ha disminuido considerablemente, pero se mantiene la misma tendencia hasta los 120 °C, lo que nos indica que la degradación de los antocianinas es más rápida que en el rango anterior de temperatura (Rebolledo, 2007).

Existen otros estudios que determinan la vida media de ciertas antocianinas demostrando que la temperatura puede jugar un factor crucial para la degradación de las antocianinas.

Olaya et al. (2009) determinó que las moras de Castilla microencapsuladas y sometidas a temperaturas de 25°C y 40°C y a una  $A_w$  de 0,20 y 0,35, la vida media del pigmento variaron entre 11 y 32 días. Por otro lado, se realizaron estudios en jugos de agraz en la que se demostró que una temperatura más alta puede ejercer efectos más dañinos; cuando se aplicó una temperatura de 37°C la vida media del pigmento fue de 3,0 semanas, mientras que a 4°C la vida media fue de 7,5 semanas (Zambrano et al., 2009).

### ÁCIDO ASCÓRBICO

El ácido ascórbico o también conocido como vitamina C es un derivado de azúcar de seis carbonos que participa en reacciones de hidroxilación. Este ácido se halla presente en todos los tejidos de los animales y de las plantas superiores. Las fuentes de vitamina C son básicamente los cítricos, las patatas, los vegetales y los tomates (Melo y Cuamatzi, 2006). Se ha observado que el ácido ascórbico degrada el color de las antocianinas. También se sospecha una gran actividad por parte de productos de degradación del ácido deshidroascórbico (ADA) al degradar antocianinas que pierden color y forma precipitados color café. Actualmente el mecanismo de esta reacción no está completamente claro pero se sospecha que se está dada por la intervención de un peróxido el cual degrada a las antocianinas (Sordo, 2004).

### ESTABILIZACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS

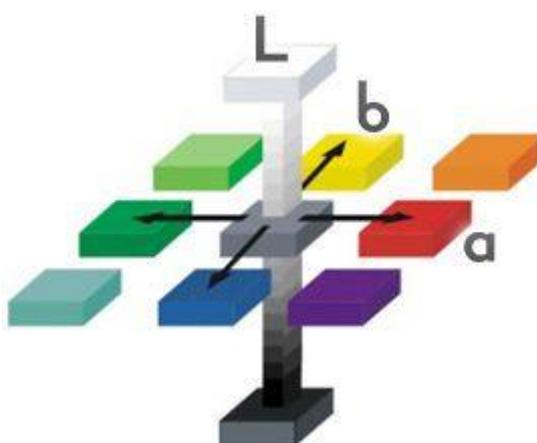
Como es de conocimiento el color juega un papel importante en la aceptabilidad de los alimentos, los consumidores primero juzgan la calidad del producto por su color, es por eso que la industria ha usado colorantes para realzar o recuperar la apariencia de ciertos alimentos. Es por esta razón que se ha interesado en el uso de las antocianinas, puesto que son colorantes naturales y más allá de su color su interés ha girado hacia la salud del

consumidor, pues sus amplios beneficios ya nombrados han captado la atención de muchos. Como ya se mencionó la estabilidad de las antocianinas es el mayor problema para su uso e incorporación en matrices alimentarias (Giusti y Wrolstad, 2003). Por estas dificultades, se ha recurrido a métodos para estabilizar las antocianinas el más común es la microencapsulación. Esta tecnología es conocida como los empaquetamientos de materiales sólidos, líquidos o gaseosos. Las microcápsulas selladas pueden liberar sus contenidos a velocidades controladas bajo condiciones específicas, y pueden proteger el producto encapsulado de la luz y el oxígeno. Consiste en micropartículas conformadas por una membrana polimérica porosa contenedora de una sustancia activa. Los materiales que se utilizan para el encapsulamiento pueden ser gelatina, grasas, aceites, goma arábiga, alginato de calcio, ceras, almidón de trigo, maíz, arroz, papa, nylon, ciclodextrina, maltoextrina, caseinato de sodio, proteína de lactosuero o proteína de soya (Parra, 2011). Los procesos de encapsulación fueron desarrollados entre los años 1930 y 1940 por la National Cash Register para la aplicación comercial de un tinte a partir de gelatina como agente encapsulante (Yañez et al., 2002); su comienzo en los productos de microencapsulación se inició en 1950 en las investigaciones dentro de la presión-sensitiva de cubierta para la elaboración de papel destinado a copias (Madene, Scher y Desobry, 2006). Hoy en día muchas sustancias pueden ser encapsuladas en partículas en polvo sólidas o ellas pueden ser microencapsuladas en emulsiones estructuradas (Palzer, 2009). Dentro de esto tenemos a las antocianinas, la microencapsulación al utilizar secado por aspersión, es un método económico para la preservación de colorantes naturales (Ersus y Yurdagel, 2007).

## COPIGMENTACIÓN

Los copigmentos son sustancias que protegen a la antocianina y de esta manera contribuyen a su coloración (Delgado et al., 2000). Un copigmento actúa de forma intermolecular donde su función es prevenir un ataque nucleofílico que se da por una molécula de agua al catión flavilio que es el responsable de la coloración (Sarma, 1997). Se sabe que las antocianinas son capaces de formar complejos consigo mismas y con otros compuestos orgánicos. Estos compuestos por sí mismos no tienen color, pero potencian el color de las antocianinas al producir un efecto batocrómico ( $\Delta\lambda_{\max}$ ) o un efecto hiperocrómico ( $\Delta A$ ) (Fennema, 2000). Un efecto batocrómico es un fenómeno que se da cuando la absorción máxima se cambia a una longitud de onda más alta que la usual donde el catión flavilio y la base quinoidal son quienes juegan un rol en este efecto (Rein, 2005). Mientras que el efecto hiperocrómico se ve en donde la intensidad del color A (generalmente el color rojo según el Color Lab) (León et al., 2006) es aumentada por la copigmentación ya que estabiliza la molécula (Figura 3)

FIGURA 3. TABLA DE COLOR L\*A\*B



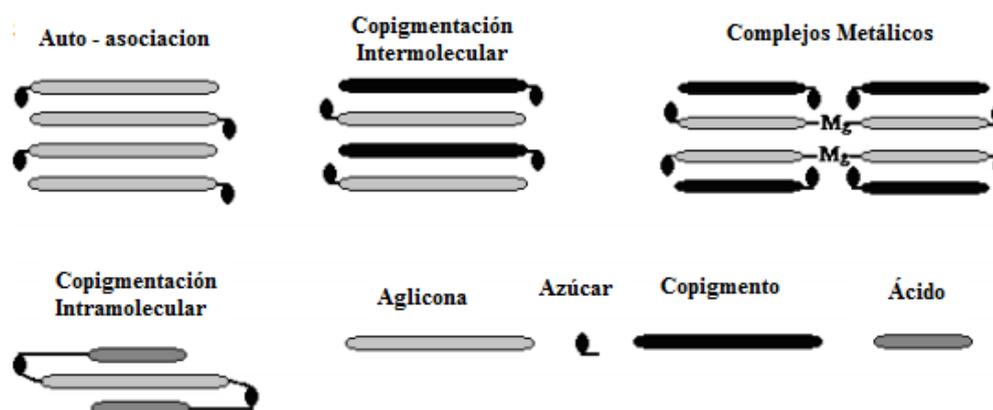
FUENTE: LEÓN ET AL., 2006

La copigmentación puede darse ya sea por interacciones covalentes (Mazza y Brouillard, 1987) o también interacciones no covalentes (Jing, 2006). A su vez se pueden dar de forma

natural, es decir con interacciones propias dentro de la planta; o por forma sintética durante la extracción, procesamiento o almacenamiento (Thorngate y Singleton, 1994). La copigmentación puede formarse con fenoles, ejemplos de estos pueden ser flavonoles, ácido cafeico, rutina o ácido clorogénico (Jing, 2006) o también con polifenoles como son los taninos (Baubles y Berber, 1995). Otra forma de una copigmentación es de manera intramolecular, y esta se da principalmente debido a la acilación de las antocianinas que evitan el ataque nucleofílico de las mismas moléculas de agua (Saito et al., 1993).

Rein (2005) establece los diferentes tipos de asociaciones que existen para que la antocianina tenga un efecto de copigmentación (Figura 4) y cada uno depende de los componentes y a su vez de la estructura de la antocianina. Se puede ver que cada interacción se da de diferente manera, sin embargo cada una juega un papel muy importante en la estabilidad de las antocianinas.

FIGURA 4. INTERACCIONES DE LAS ANTOCIANINAS



FUENTE: REIN, 2005

#### ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO

El maíz morado es rico en antioxidantes (antocianinas), la antocianina presente en mayor cantidad es la cianidina 3- glucósido (Nakatani et al., 1979). Pero también existen cantidad

significantes de pelargonidina y peonidina (Styles y Cerka, 1972). Actualmente las antocianinas tanto en maíz morado y azul están siendo usadas para la producción de tortillas azules. Adicionalmente Abdel- Aal et al. (2010) reportaron que el maíz con granos de color azul, rosado y púrpura tienen un alto contenido de antocianinas, especialmente el maíz morado (1277 ug/g). Las antocianinas del maíz morado están presentes en mayor cantidad en el pericarpio representando valores entre 504.0 a 1473.0 mg/100mg (Jing et al., 2006) aunque existen otros autores que reportan valores más altos como por ejemplo 1640 mg/100g (Cevallos y Cisneros, 2003). Se dan estos rangos en el contenido de antocianinas ya que dependen de la variedad y la región en la que está cultivado el maíz (Jing et al., 2006). Se ha observado que el ambiente en donde crece este maíz interviene en la concentración y composición de las antocianinas presentes. Son estas las razones por las cuales no solo se debe promover el cultivo sino que se debe hacer un buen manejo a lo largo de su producción para asegurar un máximo contenido de antocianinas (Shipp y Abdel-Aal, 2010). Nuevas fuentes, con alto contenido de pigmentos de antocianina, se deben buscar y probar su estabilidad. El maíz morado representa un cultivo de bajo costo con alta rendimiento de pigmento que podría ser fuentes de antocianinas para el mercado colorante alimentario (Cevallos y Cisneros, 2003).

La extracción y uso de pigmentos del grano de maíz (*Zea mays L.*) como colorantes en yogur fue estudiada por Salinas et al. (2005) donde se determinó el uso potencial de las antocianinas extraídas de granos de maíz, como colorantes en yogur. Estos autores reportan que las antocianinas extraídas de la fracción pericarpio-capa de aleurona fueron añadidas a un yogur natural comercial, en concentración de 1 mg/100 g de yogur. Este tan solo es un ejemplo de lo que se puede hacer con las antocianinas del maíz morado.

Estudios realizados por Jing et al. (2006) determinaron que la cantidad de antocianinas del maíz morado del Perú es de 30.5 a 47.1% en relación total a los compuestos fenólicos. Dentro de esta cantidad alrededor del 40% son antocianinas aciladas demostrando su capacidad de estabilidad (Aoki et al., 2002).

### **3.3 AZÚCARES**

Los azúcares son carbohidratos solubles en el agua, dentro de estos están los monosacáridos que son las moléculas de hidratos de carbono más pequeñas, los disacáridos que por hidrólisis dan dos monosacáridos y los polisacáridos que incluyen el almidón y la celulosa originan por hidrolisis muchas moléculas de monosacáridos (Chang, 2008).

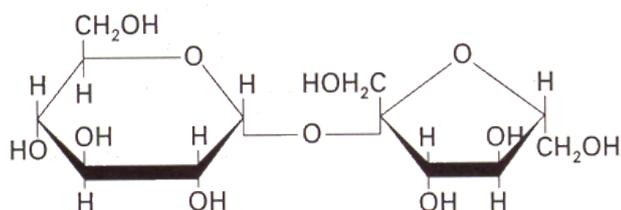
La influencia de los azúcares en la estabilidad de las antocianinas ha sido controversial en varios estudios demostrando en algunos como los azúcares mejoran la estabilidad de las antocianinas, no las afecta o las perjudica. Muchas investigaciones realizadas han trabajado con la adición de diferentes aditivos como: ácidos, azúcares, sales, hidrocoloides y diferentes compuestos fenólicos con el propósito de mejorar la estabilidad de antocianinas. Una reciente publicación demostró que se puede utilizar el azúcar para la prevención de degradación termal de antocianinas en zumo de mora. Utilizando 10% de sacarosa, fructosa, glucosa y trehalosa; la adición de trehalosa tuvo el mayor impacto en la estabilidad de las antocianinas. Concluyendo que la formulación cuidadosa de comidas, en ese caso adición de azúcar a zumo de mora, puede minimizar la degradación de antocianinas durante el calentamiento (Kopjar y Pilizota, 2011). Las concentraciones altas de azúcar (> 20 %) o de jarabe para preservar las frutas o jugo de frutas, tienden a ejercer un efecto protector sobre la antocianina (Justiniano, 2010). En otro estudio realizado por Wrolstad et al. (1990) se analizó el efecto protector que tiene la sucralosa sobre puré de

fresa; y en las que se encontró que a mayor cantidad de azúcar mejoró el efecto. Este resultado puede ser analizado con la reducción de actividad de agua en el producto en el que estabiliza a las antocianinas (De Ancos et al., 1999). A concentraciones bajas, la fructuosa, arabinosa, lactosa y sorbosa tiene un efecto degradativo mayor sobre las antocianinas que la glucosa, sacarosa y maltosa (Fennema, 2000). Duhard et al. (1997) encontró que no hay diferencia en la estabilidad de la antocianina frente al calor al usar azúcar y no azúcar en un modelo de bebida comercial. Calvi y Francis (1978) reportaron estabilización en condiciones de almacenamiento para las antocianinas de uva en un modelo de jugo por la adición del 15% de sucrosa o glucosa. Sin embargo, la estabilidad térmica se redujo al añadir 15% de sacarosa en contraste a la adición del 15% de glucosa. También se ha visto que la mezcla de ácidos con azúcares como en el caso de sorbitol con ácido cítrico exhibe estabilización en la grosella negra (Hubberman et al., 2006). El efecto del azúcar añadido sobre la estabilidad de la antocianina depende de su estructura, concentración y tipo de azúcar. Wrolstad et al. (1990) reportaron que la concentración de sacarosa al 30% incrementaba la estabilidad de antocianinas en fresas. Por otro lado una baja concentración (86 g L<sup>-1</sup>) la degradación de antocianinas de col morada, grosella negra y “elderberry” mientras lo opuesto sucedía con el extracto de uva (Dyrby et al., 2001). Rizzolo et al. (2003) reportó que el contenido total de antocianinas en almacenamiento no mostró diferencia significativa a 10 y -20°C, y no hubo cambio a -30°C. No se observó ninguna influencia en la adición de azúcares (Nikkhah y Khayamy, 2007). Mientras en otros estudios, la adición del 40% de sorbosa, arabinosa y levulosa en las antocianinas de fresa redujo la vida media del pigmento.

## SACAROSA

Es el disacárido más extendido en el reino vegetal. Se encuentra en casi todos los frutos y en muchas semillas de plantas, sobre todo en la remolacha (16-20%) y en la caña de azúcar (14-16%), que se produce principalmente en la India, Brasil, Cuba, China, México, EE.UU y Filipinas (Beyer, 1987). Este azúcar se obtiene por hidrólisis ácida de una mezcla equimolar de los dos monosacáridos que la componen: la D-glucosa y la D-fructosa (Allinger et al., 1984).

FIGURA 5. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA SACAROSA

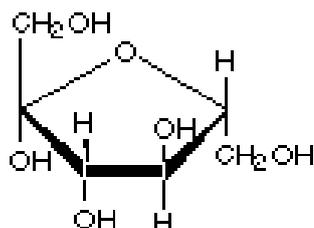


FUENTE: BEYER, 1987

## FRUCTOSA

La fructosa es un monosacárido identificado comúnmente como el azúcar de las frutas, su fórmula química es idéntica a la de la glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) pero difiere en su estructura molecular. La fructosa hace parte del grupo de carbohidratos llamados monosacáridos simples, aporta 4 kilocalorías por gramo y su poder endulzante es 170 veces mayor que el de la sacarosa o azúcar de mesa (Lê y Tappy, 2006).

FIGURA 6. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA FRUCTOSA



FUENTE: LÊ Y TAPPY, 2006

Este monosacárido está presente en alimentos como las frutas, verduras y miel. La fructosa a pesar de tener una fórmula química similar a la glucosa, presenta diferencias en su metabolismo ya que esta es absorbida más lentamente, aunque es captada y metabolizada de manera más rápida por el hígado su efecto estimulante resulta siendo inferior es decir la liberación de insulina se da de manera más lenta (Riveros et al., 2014).

### **3.4 IONES METÁLICOS**

Un ion es un átomo o grupo de átomos cargados eléctricamente, los que tienen carga positiva se llaman cationes y los de carga negativa aniones. Los elementos metálicos como el cobre, hierro, zinc, aluminio, etc. son muy comunes, sin embargo es raro encontrarlos puros en la naturaleza (Cane y Sellwood, 1994). Los complejos entre metales y antocianinas están muy extendidos en el reino vegetal y amplían el espectro de color de flores. Las antocianinas con grupos hidroxilo y fenólicos vecinos pueden secuestrar numerosos metales multivalentes. La formación de complejos con metales produce una desviación batocrómica hacia el azul. Se ha empleado la adición de  $\text{AlCl}_3$  a soluciones de antocianinas como método analítico para diferenciar entre cianidina, petunidina y delfinidina de la pelargonidina, peonidina y malvidina. Este último grupo no reacciona con el ion  $\text{Al}^{3+}$  debido a que no tiene hidroxilos y fenólicos vecinos (Fennema, 2000).

En el caso de iones metálicos, existen los mismos resultados controversiales frente al efecto sobre las antocianinas. Puesto a que se forman complejos de metal al reaccionar con aluminio, cobre y hierro. El complejo antocianina-metal solamente se forma para la cianidina, delfinidina y petunidina ya que pueden formar sus uniones con los metales por el grupo hidroxilo libre que tienen en sus anillos (Rein, 2005). Se ha observado que el calcio, hierro, aluminio y estaño ofrecen ciertas protecciones a las antocianinas de los zumos de

arándano americano; sin embargo, la decoloración azul y parda producido por los complejos metal-tanino contrarresta cualquier efecto beneficioso (Fenneman, 2000). Sin embargo, existen otros estudios en los que se determina que la adición de iones metálicos puede tener diferentes efectos sobre las diferentes antocianinas. Las antocianinas del grupo delphinidina, petunidina y cianidina, como es el en caso del maíz morado, son capaces de formar complejos con metales por su grupo hidroxilo libre en el anillo B (Rein, 2005). En productos como puré de frutilla (Wrolstad y Erlandson, 1973), jugo de arándano (Starr y Francis, 1974) y “crowberry” (Kalio et al., 1986) se ha visto que la adición de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Al}^{3+}$  mejora la estabilidad de las antocianinas. Se ha reportado también que los quelatos de antocianinas-metales interaccionan de cierta manera con algunos polisacáridos incluyendo la pectina para mantener la estabilidad de color del complejo. Cationes metálicos son capaces de unir antocianinas con polisacáridos para formar un complejo estable (Tachibana et al., 2013). En investigaciones realizadas en China, se establece que la adición de conservantes alimenticios e iones metálicos pueden tener diferentes efectos sobre el color y la estabilidad de las antocianinas cianidinas. Entre los resultados indicaron que los iones  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Al}^{2+}$  demuestran efectos aumentados en el color, pero no en la estabilidad del mismo. El  $\text{Zn}^{2+}$  y el  $\text{Mn}^{2+}$  han mostrado efectos positivos en la estabilidad y en el color, y por último el benzoato de sodio aumenta la estabilidad de las antocianinas cianidinas (Li et al., 2009). Según Yao et al. (2006) la adición de iones metálicos como  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y ácido benzoico no causaron la destrucción de las antocianinas. A su vez, se realizó un estudio sobre los metales presentes dentro del maíz morado y se encontró que el calcio, el magnesio, el cobre y el zinc presentes en el área donde hay mayor cantidad de antocianinas en el grano, lo ayudan a estabilizarlo (Castañeda et al., 2006). La copigmentación ha sido sugerida como el principal mecanismo para la estabilización de color, un copigmento

puede ser flavonoide, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, polisacáridos, metales y las mismas antocianinas (Mazza y Brouillard, 1990).

#### SULFATO FERROSO

El sulfato ferroso se obtiene como subproducto del decapado de acero y de muchas operaciones químicas, también por la acción del ácido sulfúrico diluido sobre el hierro y por oxidación de piritas al aire seguida de lixiviación y tratamiento con residuos de hierro (Distribuidora de Químicos Industriales, 2009).

#### FOSFATO DE CALCIO

El fosfato de calcio es una familia mineral con la fórmula empírica de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Dentro de sus aplicaciones, la industria alimenticia lo usa para la elaboración de quesos y procesos de panificación (USDA, 2014). El calcio es indispensable para la estructura ósea del cuerpo humano, y a su vez el fósforo forma parte muy importante del ADN y ARN (Chang, 2007). Es importante tomar en cuenta que para pacientes con fallas renales no se debe consumir cantidades superiores a 1000 mg al día de fosfato de calcio y aparte se debe tomar en cuenta que la calidad usada para este aditivo debe ser alta (Ritz et al., 2012).

### 3.5 AMINOÁCIDOS

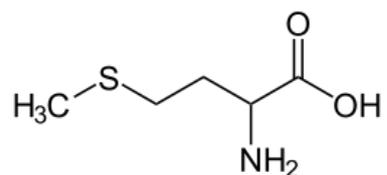
Los aminoácidos son las unidades esenciales de las proteínas. Estas son pequeños compuestos orgánicos formados de un grupo amino, un grupo lateral que se lo representa como (R) y un ácido carboxílico (Starr y Taggart, 2008). La unión de tres o más aminoácidos unidos por enlaces peptídicos forman una cadena de polipéptidos, y de esta manera se forma una secuencia de proteínas que pueden ser de estructura primaria, secundaria o terciaria (Bray et al., 2006). Para un adulto con una dieta normal el valor

diario recomendado (VDR) de las proteínas (o aminoácidos) es de 50 gramos, sin embargo, este valor cambia para mujeres embarazadas y niños menores de 4 años (Whiting, 2002). Se debe tomar en cuenta que el exceso de un aminoácido en la dieta puede obstaculizar la absorción de otro aminoácido generando descompensaciones, y a su vez la falta de aminoácidos puede tener efectos graves de salud, como por ejemplo, en la densidad ósea (Whiting, 2002). No existe mucha información sobre la interacción que tienen los aminoácidos con las antocianinas, pero estos pueden funcionar como copigmentos y así mejorar la estabilidad de los mismos. Hubberman et al. (2005) realizaron estudios en los que usaban siete aminoácidos diferentes en grosella negra para ver su efecto sobre el color durante el almacenamiento. Se observó que el triptófano mejoró el valor de A (generalmente el color rojo según el Color CIEL\*a\*b); sin embargo, este color se perdió drásticamente durante el almacenamiento. Los resultados demostraron que con el tiempo la metionina fue el aminoácido que aumentó la estabilidad y en efecto fue por una copigmentación entre este y la antocianina.

#### METIONINA

La metionina es un aminoácido esencial para el cuerpo humano ya que este no es producido por el mismo (Starr y Taggart, 2008). Este se puede encontrar en alimentos como algunos granos, cereales, carne, pescado y los huevos (Gómez, 2009). La metionina ayuda a descomponer la grasa en el cuerpo y también sirve como una molécula antioxidante ayudando a combatir los radicales libres (Balch, 1997). Hay que tomar en cuenta que junto con la tirosina, la metionina tiene mayor probabilidad de causar toxicidad en el cuerpo humano que otros aminoácidos (Whiting, 2002). Sin embargo, no existe una cantidad recomendada de la ingesta de este aminoácido y depende netamente de cada individuo, su edad, su peso, ritmo de vida y su dieta (Wardlaw et al., 2005).

FIGURA 7. MOLÉCULA DE METIONINA

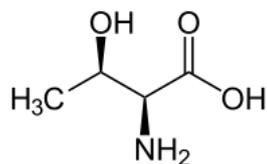


FUENTE: STARR Y TAGGART, 2008

## TREONINA

La treonina es otro aminoácido esencial para el cuerpo. Este está presente en pescado, carnes, lentejas y semillas de sésamo (Shi, 2009). Este puede ayudar a la formación de elastina y colágeno, y a su vez promueve el fortalecimiento del sistema inmunológico (Balch, 1997).

FIGURA 8. MOLÉCULA DE TREONINA



FUENTE: SHI, 2009

## **IV. METODOLOGÍA**

### **4.1 OBTENCIÓN MATERIA PRIMA**

Las dos variedades de maíz morado fueron proporcionadas por Mario Caviedes profesor de la Universidad San Francisco de Quito. Estas variedades provienen de dos grupos. El grupo A consistía en granos cuyos padres eran maíz amarillo derivados del cruce entre dos poblaciones del CIMMYT (Centro Internacional de Mejora de Maíz y Trigo) las poblaciones 5 y la 6, que segregaban granos negros. Estas dos son poblaciones con una base genética del germoplasma de maíz de tierras altas.

Los padres del grupo B fueron recolectados de El Quinche, Pichincha-Ecuador. Se realizaron dos autopolinizaciones en los dos grupos para mejorar el color de los granos negros para el desarrollo de nuevas líneas comerciales de maíz negro.

Los azúcares fueron obtenidos en el supermercado “Supermaxi” localizado en el centro comercial de Cumbayá. La sacarosa utilizada es de marca San Carlos con presentación de 1 kg, y la fructosa fue de marca Poly foods con presentación de 3 libras.

El sulfato ferroso fue obtenido de la casa comercial Loba Chemie y el fosfato de calcio de Sigma Aldrich, sus fichas técnicas se encuentran en el Anexo 8.

Los aminoácidos se obtuvieron a través de la empresa Pollo Favorita S.A. (POFASA) en presentaciones de 500gr {Anexo 8}.

### **4.2 SECADO DE MAÍZ**

Se secó el maíz morado en un horno convencional de la cocina de la Universidad San Francisco de Quito a 50°C durante 150 minutos.

### 4.3 EXTRACCIÓN DE LAS ANTOCIANINAS

El procedimiento fue basado según lo expuesto en el trabajo de Gorriti et al. (2009). Primero se pesó 2,5 gramos del maíz morado molido para luego agregar 200mL de solución etanólica al 20% (etanol a 96%), la extracción se dio con agitación durante 120 minutos. Los extractos obtenidos fueron filtrados utilizando papel filtro Whatman N°1.

### 4.4 DESTILACIÓN DEL ETANOL Y AISLAMIENTO DE LAS ANTOCIANINAS

La eliminación del etanol se realizó en un Rotavapor de marca Buchi modelo R-200/205, junto con una bomba de vacío de marca Welch Gem ® Direct-Drive Vacuum Pump Modelo 8890. A partir de cada filtrado se tomaban 160 mL de muestra y la destilación se realizaba a una presión de 400 psi hasta obtener un destilado de alrededor 35 mL (cantidad de etanol puro en la solución). Luego la solución destilada proseguía a ser enfriada por alrededor de 30 minutos para luego someterlo a pasteurización. El etanol se descartaba y se aseguraba que el embudo en el que contenía la muestra este completamente limpio y seco antes de usar la siguiente muestra.

### 4.5 CUANTIFICACIÓN ANTOCIANINAS

*Cuantificación de antocianinas según el método de pH diferencial*

Una alícuota del extracto (2mL) se diluyo en un matraz de 25 mL con soluciones buffer de cloruro de potasio (pH 1) y acetato de sodio (pH 4,5). En las soluciones preparadas se determinó el contenido de antocianinas según el método de pH diferencial, de acuerdo a Giusti & Wroslad (2001) utilizando un espectrofotómetro y su contenido se expresó como cianidina-3-glucósido de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{Total antocianinas } \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) : \frac{A * PM * FD * 1000}{E * 1}$$

Dónde:  $A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$ ; PM (Peso Molecular)= 449,2 g/mol para cianidina-3-glucósido; FD= factor de dilución; l= longitud de paso de celda en cm; E=26900 coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido; 1000= factor de conversión de g a mg. Todos los análisis fueron realizados por duplicado (n=2).

#### **4.6 PASTEURIZACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Se realizó una pasteurización instantánea o High Temperatura Short Time (HTST), este método consiste en someter el alimento a una temperatura cercana a los 79°C, durante un período de al menos 15 segundos. En el ensayo lo que se hizo fue llevar las muestras a una temperatura de 80°C por 15 segundos utilizando estufas Fisher Scientific Isotemp con modelo de serie 210N3537 y termómetros LCD Digital Waterproof Thermometer modelo BOE 311. Después de la pasteurización las muestras fueron enfriadas en un mini frigorífico ubicado en el laboratorio de Ingeniería de Alimentos de la Universidad San Francisco por 45 minutos hasta que llegue a una temperatura final entre 25 y 30°C para luego volver a cuantificar el contenido de antocianinas.

Los análisis de medición de antocianinas se realizaron en un espectrofotómetro modelo GENESYS™ 10. Los análisis en el espectrofotómetro se realizaron en celdas de 1cm, utilizando una celda para cada muestra diferente y en orden aleatorio para reducir el error experimental.

#### **4.7 MEDICIÓN DEL pH (PH: (MÉTODO 14.022 AOAC, POTENCIÓMETRO)**

Para esta medición se utilizó el potenciómetro Fisher Scientific accumet pH meter modelo AR50. Este equipo usa electrodo para medir el pH de una solución. Este equipo fue previamente calibrado con soluciones a pH 4,7 y 9, con el fin de garantizar una medición exacta.

#### **4.8 MOLÉCULAS UTILIZADAS PARA LA ESTABILIZACIÓN**

Se pesó un 10, 15 y 20% tanto de sacarosa como de fructosa según el peso del volumen del extracto obtenido. Para los aminoácidos se utilizaron metionina y treonina en un 0,4% (p/v) en relación al volumen del extracto. Los iones de hierro (en forma de sulfato ferroso) y calcio (en forma de fosfato de calcio) se los utilizó en una concentración de 0,025M y 0,05M.

#### **4.9 DISEÑO EXPERIMENTAL**

En cada estudio se utilizó un DCA (Diseño Completamente al Azar) con un nivel de significancia de 0,05. Las variables que se midieron fueron pH y cantidad de antocianinas con tres repeticiones cada una. Para el test de comparación múltiple se utilizó el de DUNCAN.

Para la combinación de antocianinas con azúcares se analizaron 4 tratamientos tanto para fructosa como para sacarosa en concentraciones de 0%, 10%, 15% y 20%. Para la combinación de antocianinas con iones metálicos se estudiaron un total de 5 tratamientos en los cuales se utilizaron dos concentraciones, 0,025M y 0,050M para hierro, calcio y un control. Por último, para la mezcla de antocianinas con aminoácidos se realizaron 3 tratamientos, utilizando una concentración de 0,4% de metionina y treonina, más un control.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE TRES VARIEDADES DE MAÍZ

TABLA 2 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS PROCEDENTES DE TRES TIPOS DE MAÍZ (mg/g).

FV	gl	SC	CM	Fc	Ft
TOTAL	17	816,886066			
TRAT	2	799,886215	399,943107	352,894062*	3,68
ERROR EXP	15	16,9998514	1,13332343		

\*Significativo al 5% de probabilidad por la prueba F

TABLA 3 PRUEBA DE DUNCAN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS PROCEDENTES DE TRES TIPOS DE MAÍZ (mg/g).

Tratamiento	B	A	C
	3,27	4,66	18,06
	c	b	a

Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Duncan.

RMD*Sy	1,3081809	1,37337264
--------	-----------	------------

La primera fase del experimento tuvo como propósito determinar el contenido de antocianinas de tres variedades de maíz morado. Una de las variedades provenía del Perú (C) y las otras dos son mejoradas y provenientes del Ecuador (A y B). El coeficiente de variación de 12% y una desviación estándar de 0,435. El coeficiente de variación (CV) es alto debido a las siguientes razones; primero puede deberse a que es una estimación en base a la fórmula de pH diferencial y este puede presentar un grado de error en sus resultados. Otro motivo se puede asumir al ajuste metodológico realizado, ya que la destilación del etanol podría no haber sido homogénea en todas las muestras. Por último, puede deberse a que exista un grado de turbidez en la solución que altere la lectura de la absorbancia de las mismas. Existió diferencia significativa en la cantidad de antocianinas

de las diferentes variedades de maíz morado (Tabla 2). Siendo la variedad C la de mayor contenido de antocianinas seguida por la A y por último la B (Tabla 3).

El contenido de antocianinas de las diferentes variedades de maíz morado varió como era de esperarse ya que la variedad C era proveniente del Perú que denota un color morado mucho más intenso que las otras dos variedades mejoradas que son provenientes del Ecuador (Anexo 4). Según un estudio de Gorriti et al. (2009) los resultados mostraron que en el maíz morado (*Zea Mays L.*) se encontraban entre 8,404 y 47,984 mg antocianinas/g por muestra determinados según el método de pH diferencial. La variedad C se encuentra dentro de estos rangos mientras las variedades A y B son mucho menores, esto se debe a que son modificadas y no presentan esa tonalidad morada que tiene la C. Sin embargo siendo las dos variedades mejoradas la variedad A fue significativamente mejor ya que presentó un mayor contenido de antocianinas que la variedad B. Pero si se comparan estos valores con un trabajo de Yang et al. (2007) relacionado con la extracción óptima de antocianinas de corontas del maíz morado de un cultivar de la China en mezclas etanólicas y metanólicas al 80, 90 y 100% (v/v) acondicionadas convenientemente en medio ácido con los ácidos acético y cítrico al 0,25, 0,5 y 1% (v/v) encontraron valores cercanos a 6 mg/g muestra (5,90 mg de antocianina/g muestra), siendo este valor más cercano a los de las variedades A y B del estudio. Como se había mencionado China tiene alta producción de maíz morado, sin embargo la concentración del pigmento es menor y estas variedades mejoradas del Ecuador tenían valores de antocianinas similares pudiendo ser competentes en el mercado internacional.

Para el estudio no se utilizó la variedad C a pesar de ser la de mayor cantidad de antocianinas solo se quería comparar si existía una gran diferencia entre el maíz peruano y el ecuatoriano, resultando significativamente diferentes. El interés verdadero era utilizar

una de estas dos variedades mejoradas provenientes del Ecuador para llamar la atención acerca de estas novedosas materias primas y que en un futuro se incorporen en la dieta del ecuatoriano para alejarnos de aquellos productos que no aporten un beneficio a nuestra salud. Y que posiblemente ayuden a reducir la incidencia de diversas enfermedades. Por eso se procedió a realizar todo el estudio utilizando la variedad A.

## 5.2 CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO USANDO DIFERENTES AZÚCARES A DIFERENTES CONCENTRACIONES

TABLA 4 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA PÉRDIDA DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES AZÚCARES DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN (mg/g).

FV	gl	SC	CM	Fc	Ft
TOTAL	27	5,36655691			
TRAT	6	4,52701243	0,75450207	18,8727862*	2,57
ERROR EXP	21	0,83954448	0,03997831		

\*Significativo al 5% de probabilidad por la prueba F

TABLA 5 PRUEBA DE DUNCAN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LAS PÉRDIDAS DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES AZÚCARES DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN (mg/g).

Tratamiento	15% Sacarosa	Blanco	10% Sacarosa	20% Sacarosa	10% Fructosa	15% Fructosa	20% Fructosa
	1,05	1,10	1,25	1,30	1,93	1,97	2,02
	edc	edc	dc	c	ba	ba	a

Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Duncan.

RMD*Sy	0,29492	0,30991593	0,31891349	0,32491187	0,32991051	0,33390943
--------	---------	------------	------------	------------	------------	------------

Se sabe que el efecto que tiene el azúcar va a depender de la estructura de la antocianina y también del tipo y concentración del azúcar utilizada (Cavalcanti et al., 2011). El coeficiente de variación (CV) fue de 13% y la desviación estándar de 0,0999; el valor del CV fue alto, por las mismas razones mencionadas con anterioridad. La tabla del ANOVA para los análisis de la cuantificación de la pérdida de antocianinas del maíz morado mezcladas con azúcares en diferentes concentraciones y luego sometidas a temperaturas de pasteurización, demuestran que existió una diferencia significativa entre los diferentes porcentajes de sacarosa y fructosa usados para la estabilización de las antocianinas (Tabla 4).

Para poder determinar si existieron diferencias entre los diferentes tratamientos se aplicó la prueba de DUNCAN (Tabla 5). Esta tabla demuestra que los tratamientos que comparten el mismo rango con el blanco fueron los tratamiento de 10% y 15% de sacarosa. Esto

demuestra que tanto el blanco como los tratamientos con 10% y 15% de sacarosa son aquellos en los que se vieron menores pérdidas de antocianinas luego de la pasteurización. Por otro lado el agregar fructosa provocó más daño en la estabilización de las antocianinas que la sacarosa. El 10, 15 y 20% de fructosa compartieron el mismo rango (“a”), es decir que estas concentraciones tuvieron un mayor impacto sobre la estabilidad de los pigmentos.

En base a los resultados experimentales se pudo ver que el efecto de la fructosa es más agresivo que la sacarosa. Esta información se puede sustentar con la idea de que los azúcares reductores, como la fructosa, crean mayor daño a las antocianinas que los azúcares no reductores como la sacarosa (Fennema, 2000). En este caso la adición de 10, 15 y 20% de sacarosa no estabilizó pero tampoco afectó más a las antocianinas, pues comparten el mismo rango con el blanco (“c”).

El porcentaje de azúcar tuvo un efecto significativo en la estabilidad de las antocianinas ante el calentamiento. De acuerdo con la prueba de DUNCAN (Tabla 5) que mostró que el efecto negativo causado sobre la antocianina fueron los tratamiento en los cuales se utilizaba fructosa. Rubinskiene et al. (2005) sustentan estos resultados al demostrar que la fructosa tiene efectos más agresivos sobre las antocianinas que el aspartame y la glucosa; y se corrobora con la información en otro estudio en el que se determina que la degradación se ve principalmente afectada por la fructosa, siguiéndole luego la sacarosa y por último, la glucosa es el azúcar que menos afecta (Cao et al., 2009). Una razón por la que la fructosa tuvo mayor efecto en la degradación es que este monosacárido es una cetohexosa y tiene la capacidad de formar más rápido el compuesto furfural una vez que haya sido sometido a calentamiento que la glucosa y la sacarosa. El compuesto furfural es un derivado de pentosas que se da por una deshidratación cuando los monosacáridos son sometidos a calor

y están en un medio ácido (Díaz et al., 2005). En base a estos resultados, se demostró que para la antocianina del maíz morado (cianidina 3-glucósido) la sacarosa no afectó la estabilidad ya que es significativamente igual al blanco, por otro lado fructosa afectó notablemente la estabilidad de las antocianinas.

Por otro lado, los tratamientos que fueron significativamente iguales al blanco son todos en los que se utilizó la sacarosa. Los resultados son sustentados con estudios realizados por Kopjar y Pilizota (2011) en los que demuestran que la adición del 10% de sacarosa puede ayudar a la estabilidad de las antocianinas; por otro lado, Hubberman (2005) demostró que la adición del 15% de sacarosa a un modelo de jugo de uva tuvo mejor efecto que la adición de un azúcar reductor como la glucosa. Esto coincide con los resultados que se obtuvieron en el presente estudio que determina que el rango entre el 10 y 15% de sacarosa podría no afectar tanto a una bebida comercial. A su vez estudios realizados para determinar una producción de antocianinas óptima en sistemas de cultivos celulares, encuentran que la adición entre el 6 y 12% de sacarosa ayudaron significativamente a la producción de la misma (Miñano et al., 2004). Tsai et al. (2005) demostraron que a concentraciones mayores del 20% de sacarosa, se ve un mayor efecto negativo en la estabilidad de las antocianinas. Se demuestra que a estas concentraciones las antocianinas sobrepasan un efecto hipercrómico antes de sobrepasar cualquier efecto térmico; sin embargo los productos de pardeamiento son quienes pueden realzar el efecto de descoloración de las mismas. Las bebidas que utilizan maíz morado, como la chicha morada, contienen alrededor de 8.8 y 12.8% de azúcar en su formulación. Por lo que si se utilizara un 10% de sacarosa la bebida de chicha morado no se vería mayormente perjudicada.

Se realizó un análisis de medición de pH para cada tratamiento con el fin de verificar que estos estén dentro de rangos aceptables y a su vez, este análisis sirve para ver si es que existe algún comportamiento sobre el pH diferente dependiendo del azúcar. El experimento tuvo un coeficiente de variación de 0,58% y una desviación estándar de 0,0185; estos valores son bajos ya que se usó el potenciómetro y este puede representar menos errores.

**TABLA 6 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL pH DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES AZÚCARES DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN.**

FV	gl	SC	CM	Fc	Ft
TOTAL	27	0,61589643			
TRAT	6	0,58692143	0,09782024	70,8964625*	2,57
ERROR EXP	21	0,028975	0,00137976		

\*Significativo al 5% de probabilidad por la prueba F.

**TABLA 7 PRUEBA DE DUNCAN PARA EL ANÁLISIS DE pH DE LAS ANTOCIANINAS DE MAIZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES AZÚCARES DESPUES DE LA PASTEURIZACIÓN.**

Tratamiento	20% saca	15% saca	20% fruc	10% saca	15% fruc	10% fruc	Blanco
	6,18	6,20	6,32	6,37	6,48	6,52	6,61
	d	d	c	c	b	b	a

Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Duncan.

RMD*Sy	0,05465908	0,05744497	0,0591165	0,060268	0,06119663	0,06190239
--------	------------	------------	-----------	----------	------------	------------

El ANOVA determinó que si existieron diferencias significativas en los valores de pH para los tratamientos en los cuales se utilizaron azúcares para la estabilización de los pigmentos (Tabla 6). Para determinar la diferencia entre los tratamientos se realizó la prueba de DUNCAN y se estableció que los tratamientos que tienen el mismo rango son el 15 y 20% de sacarosa (6,18 6,20), 20% de fructosa y 10% de sacarosa (6,32 y 6,37) y por último el 15 y 10% de fructosa (6,48 y 6,52). A su vez, se puede señalar que el tratamiento que obtuvo el pH más básico fue el blanco con un valor de 6,61. Los rangos establecidos en

esta prueba fueron diferentes a los obtenidos en la prueba de DUNCAN de la Tabla 4 esto comprobó que la estabilidad del tratamiento fue afectada dependiendo del tipo y concentración de azúcar que se utilizó y no por el cambio de pH. En el caso del análisis de pH se observó que los tratamientos del 10% de sacarosa y 20% de fructosa son estadísticamente iguales, sin embargo el efecto del 20% de fructosa sobre la estabilidad de las antocianinas fue uno de los tratamientos en el que se dieron mayores pérdidas de antocianinas. En base a estos resultados se puede señalar que sí existió una interacción entre la molécula de azúcar y la antocianina y que el pH no jugó un rol determinante en la estabilidad de la misma. La antocianina del maíz morado es acilada y por lo tanto puede ser más estable a rangos ligeramente ácidos o soluciones acuosas neutras (Fossen et al., 1998).

### 5.3 CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO USANDO SULFATO FERROSO Y FOSFATO DE CALCIO A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

**TABLA 8 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LAS PÉRDIDAS DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES IONES DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN (mg/g).**

FV	gl	SC	CM	Fc	Ft
TOTAL	24	2,09312719			
TRAT	4	1,48773874	0,37193468	12,287472*	2,87
ERROR EXP	20	0,60538845	0,03026942		

\*Significativo al 5% de probabilidad por la prueba F.

**TABLA 9 PRUEBA DE DUNCAN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LAS PÉRDIDAS DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES IONES DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN (mg/g).**

Tratamiento	0,025M Fe	0,025M Ca	Blanco	0,05M Ca	0,05M Fe
	1,10	1,15	1,17	1,43	1,75
	dc	dc	c	b	a

Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Duncan.

RMD*Sy	0,2295298	0,24120081	0,24820341	0,25287182
--------	-----------	------------	------------	------------

En el experimento de la adición de iones en los extractos de antocianinas se obtuvo un coeficiente de variación de 13% y una desviación estándar de 0,077. Según el ANOVA (Tabla 8) existió una diferencia significativa entre las concentraciones de iones usadas para la estabilización de antocianinas. En cuanto a la prueba de rango múltiple DUNCAN (Tabla 9) se observa que la concentración 0,025M tanto de hierro como de calcio son estadísticamente iguales que el blanco, lo que indicó que a esa concentración esos iones no afectaron la estabilidad ni la mejoraron, se mantuvieron como el blanco. Mientras que las concentraciones 0,05 M de hierro y calcio son los tratamientos más dañinos de todos, siendo el de hierro el que más perjudicó a los antioxidantes.

El uso de iones metálicos como moléculas estabilizantes para las antocianinas ha sido muy controversial dando resultados positivos en ciertos estudios como negativos en otros. En el caso de la presente investigación lo que se pudo observar es que no se estabilizaron las antocianinas como se esperaba, sin embargo, una concentración de 0,025M de hierro y de calcio muestran que la cantidad de antocianinas que se destruyen son iguales que las del blanco al ser sometidas a temperatura de pasteurización. Tachibana et al. (2013) demostraron que al realizar la combinación de la cianidina-3-glucósido con  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$  mostraron que fue estabilizada térmicamente aunque se formaban ciertos aglomerados, que lograron evitar la formación de aglomerados usando alginato el cual ayudaba a la formación de un complejo estable. Estos investigadores sí lograron estabilizar las antocianinas frente a temperaturas, lo que no sucedió en nuestro estudio, pudo deberse a la concentración de hierro usado lo cual no es mencionado en el trabajo de Tachibana et al. (2013). Los resultados obtenidos mostraron que una cantidad de 0,05M de hierro tiene un efecto negativo mayor que una concentración de 0,025M del mismo ion, por lo que se podría pensar que si se utiliza una concentración menor a 0,025M podría obtenerse mejores resultados sobre la estabilidad de las antocianinas. Es muy importante resaltar también que solo la cianidina, delfidina y la petunidina son capaces de tener una quelación con un metal debido a que tienen más de un grupo hidroxilo libre en su anillo cromano. Los metales más comunes que forman complejos con estas antocianinas son estaño, cobre, hierro, aluminio, magnesio y potasio. Otro aspecto a tomar en cuenta es que según Kunsági-Máté et al. (2008) el estado de oxidación de iones de hierro juega un papel crucial en la formación de complejos copigmentantes. Sin embargo, el calcio también ha tenido efectos sobre las antocianinas como mencionan Castañeda-Ovando et al. (2009) y González-Manzano et al. (2008) cuando evaluaron el contenido metálico en el maíz morado demostraron que los que se hallaban en mayor cantidad eran calcio, cobre y hierro y que si son capaces de formar un

complejo con la cianidina (antocianina mayoritaria en el maíz morado) y estabilizándola según constantes de estabilidad estimadas por electroforesis de capilaridad. La asociación de las antocianinas con otros compuestos afectan su estabilidad, probando que son un importante mecanismo de estabilización, sin embargo, estas reacciones tienen dos desventajas la primera es que son muy difíciles de controlar y la segunda es la poca información que se tiene de estas en este método químico de estabilización (Cavalcanti et al., 2010).

Se observó que la concentración de 0,05 M de hierro es la que afecta más al extracto, pues la pérdida de antocianinas es mayor, esto se debe, a que a pesar de que el acomplejamiento puede incrementar y estabilizar el color de las antocianinas, los mismos pueden provocar pérdidas del color, ya que, considerando la habilidad de los metales como cobre y hierro de actuar como catalizadores redox generan un resultado negativo (Walford, 1980). Esto es lo que se observó en el contenido de antocianinas y es bastante drástico el cambio de color en el extracto {Anexo 6}.

**TABLA 10 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL pH DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES IONES DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN.**

FV	gl	SC	CM	Fc	Ft
TOTAL	24	20,58395			
TRAT	4	20,51328	5,12832	1451,34286*	2,87
ERROR EXP	20	0,07067	0,0035335		

\*Significativo al 5% de probabilidad por la prueba F.

**TABLA 11 PRUEBA DE DUNCAN PARA pH DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADOS CON DIFERENTES IONES DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN.**

Tratamiento	0,05 M Fe	0,025 M Fe	0,05 M Ca	0,025 M Ca	Blanco
	3,978	4,158	4,834	5,116	6,529
	e	d	c	b	a

Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Duncan.

RMD*Sy	0,0784223	0,08240987	0,08480242	0,08639745
--------	-----------	------------	------------	------------

En la variable de pH utilizando los iones metálicos el experimento tenía un coeficiente de variación de 1,20% y una desviación estándar de 0,0265. Existió una diferencia significativa en el pH de los extractos cuando se mezclan con diferentes concentraciones de iones de hierro y calcio (Tabla 10). Los rangos obtenidos a partir de la prueba de DUNCAN señalan que todos los tratamientos fueron diferentes y que el ion que proporcionó mayor acidez a los extractos fue el hierro, lógicamente ya que el sulfato ferroso tiene un pH menor que el fosfato de calcio (Tabla 11). Y como era de esperarse a mayor concentración de la sal, menor era el pH.

El pH más bajo de los tratamientos fue el de la concentración 0,05M de hierro (Tabla 11), a pesar de esto fue el tratamiento en el que se dio una mayor pérdida de antocianinas (Tabla 9), por lo que a pesar de brindar un pH más ácido la estabilidad no fue dada por ese factor sino por el ion y por su concentración. El pH ha demostrado ser el factor que mayor efecto tiene sobre el cambio de color de las antocianinas pero se han dado varios métodos para la estabilización como lo es la microencapsulación. En una solución acuosa los cuatro cromóforos de las antocianinas se encuentran en equilibrio. En un pH muy bajo el equilibrio es dominado por el catión flavilio rojo ( $AH^+$ ), cuando el pH es mayor  $AH^+$  es transformado al carbinol que es incoloro para luego convertirse en una chalcona que es incolora también. Simultáneamente, la base quinonoidal es formada a partir del catión flavilio en pequeñas cantidades cuando el valor del pH se incrementa. Ya que el catión flavilio, domina el color y es el más susceptible, es más estable en valores de pH bajos ( $<3$ ) (Hubbermann et al., 2005). Al agregar los iones se esperaba que la estabilidad fuera mayor al utilizar cualquier concentración del ion hierro ya que iba a proporcionar mayor acidez al sistema, pero no fue el caso. De hecho los tratamientos en los cuales se perdieron la misma cantidad de antocianinas que el blanco fueron los de concentraciones de 0,025M de hierro

y de calcio (Tabla 9), a pesar de que el pH del tratamiento de 0,025M de hierro proporcionaba una acidez estadísticamente menor que el tratamiento con la misma concentración de calcio (Tabla 11). Al igual que en el caso del uso de azúcares se observó que el pH no es el que está influenciando directamente sobre la estabilidad sino la cantidad de iones y el tipo de ion, en este caso el hierro y calcio en una concentración de 0,025M (Tabla 9), son los que presentaron la misma reducción en el contenido de antocianinas que el blanco cuando fueron sometidos a pasteurización.

En el estudio de Sui et al. (2014) las antocianinas fueron degradadas dramáticamente en pH 6 y solo pequeñas trazas fueron detectadas a pH de 7 y 8 incluso en pequeños tiempos de calentamiento. Por lo que un pH bajo del sistema, ayuda a reducir los daños térmicos sobre las antocianinas, particularmente cuando se utilizan temperaturas altas. Sin embargo, entre temperatura y pH la primera tiene un efecto mayor en la estabilidad de los pigmentos. Lo cual nos indicó que en el presente estudio lo que afectó la estabilidad son las moléculas usadas: iones y azúcares, por lo que podría decirse que la copigmentación tuvo incluso un mayor efecto en la estabilidad que el pH del extracto.

#### 5.4 CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO USANDO DIFERENTES AMINOÁCIDOS

TABLA 12 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL “INCREMENTO” DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES AMINOÁCIDOS DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN (mg/g).

FV	gl	SC	CM	Fc	Ft
TOTAL	11	0,11788095			
TRAT	1	0,00709164	0,00709164	0,64010165 <sup>NS</sup>	5,32
ERROR EXP	10	0,11078931	0,01107893		

El experimento en el que se utilizó metionina y treonina al 0.4% obtuvo un coeficiente de variación (CV) del 10% y una desviación estándar de 0,052. La hipótesis nula establecida para el diseño determinó que no existe una diferencia significativa en el contenido de antocianinas del extracto al usar metionina o treonina como estabilizantes, la cual es aceptada (Tabla 12). Existe muy poca información sobre la copigmentación con aminoácidos y las antocianinas del maíz morado. Sin embargo, la cantidad y los aminoácidos utilizados fueron establecidos en base al estudio realizado por Hubberman et al. (2005) en el que determinan que la metionina fue el aminoácido que más incrementó la estabilidad de las antocianinas {Anexo 7}.

Se puede determinar en las tablas del Anexo 7 que con el uso de ambos aminoácidos se observó un incremento en las antocianinas después de la pasteurización. Este aumento de porcentaje de las antocianinas explica el efecto de la copigmentación. Por otra parte, un copigmento promueve el efecto hiperocrómico en donde el color de la antocianina se intensifica (Willig, 2009). Es por esta razón, que después de la pasteurización se observó que el contenido de antocianinas aumentó, demostrando que la copigmentación creó un color más fuerte por lo que es más detectable por el espectrofotómetro a la misma longitud de onda.

La copigmentación va a ser más fuerte cuando se utiliza el copigmento en jugos o bebidas que en la antocianina aislada ya que se cree que otras moléculas juegan un papel importante en la copigmentación (Rein, 2005). Es por esta razón, que es importante mencionar que no solamente los aminoácidos son copigmentos sino que existen un sin número de compuestos que pueden ser copigmentos como los son los iones, los flavonoles, ácidos orgánicos, etc (Wilska-Jeszka y Korzuchowska, 1996). En el caso del presente estudio, se hizo en una mezcla en la que la antocianina no estaba completamente aislada de otros compuestos como polisacáridos y estos pudieron llegar a influenciar en la copigmentación.

Los resultados que se demuestran en las Tablas 39 y 40 del Anexo 7 se ve que en promedio existió un mayor “aumento” del contenido de antocianinas por parte del aminoácido metionina en un 15.23% en promedio, mientras que la treonina aumentó un 13.85%. Esto coincide con la teoría en que la metionina tiene mejores resultados que otros aminoácidos (Hubberman et al., 2005).

**TABLA 13 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL pH DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES AMINOÁCIDOS DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN.**

FV	gl	SC	CM	Fc	Ft
TOTAL	17	0,16457778			
TRAT	2	0,08447778	0,04223889	7,90990429*	3,68
ERROR EXP	15	0,0801	0,00534		

\*Significancia al 5% de probabilidad por la prueba F.

**TABLA 14 PRUEBA DE DUNCAN PARA pH DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO MEZCLADAS CON DIFERENTES AMINOÁCIDOS DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN.**

Tratamiento	Treonina	Metionina	Blanco
	6,39	6,50	6,55
	b	a	a

Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba Duncan.

RMD*Sy	0,08979693	0,09427186
--------	------------	------------

Para este estudio del pH de los diferentes tratamientos usando treonina o metionina se obtuvo un coeficiente de variación del 1% y una desviación estándar de 0,02983. Se concluyó que si existe una diferencia significativa en el pH cuando se adiciona uno de los aminoácidos al extracto para la estabilización de antocianinas. Tanto el tratamiento de la metionina como el blanco presentan el mismo rango al aplicar la prueba de DUNCAN (Tabla 14), mientras la treonina obtuvo un rango diferente indicando que es el tratamiento con el pH más bajo.

En el caso de los aminoácidos se observó que el pH del tratamiento de la metionina tiene un pH igual al del blanco, sin embargo el “incremento” observado en el contenido de las antocianinas cuando se utilizó los aminoácidos se debió no a que en realidad incremente el número de antocianinas sino que estas moléculas realzaron el color de estos pigmentos y cuando se realizó la cuantificación de antocianinas por espectrofometría el cambio de color dio valores más altos. Lo que nos lleva una vez más a comprobar que en este caso el pH no fue lo que está interfiere en la estabilidad de las antocianinas sino las interacciones dadas entre estos pigmentos y las moléculas agregadas a los extractos. Es decir, que la copigmentación con otras moléculas provee una mayor estabilidad a cambios de pH, calor y luz. Otras investigaciones también han demostrado que la copigmentación de las antocianinas con otras moléculas es el mecanismo principal de la estabilización del color de las plantas (Davies y Mazza, 1993). Al utilizar los aminoácidos se observó que el color es mucho más llamativo que cuando se usan iones o azúcares (Anexo 8) esto es un aspecto muy importante al momento de vender un producto pues al consumidor le parecerá atractivo y sus propiedades nutraceuticas proveerá un argumento fuerte para el marketing de por ejemplo una bebida de maíz. La explicación a esta característica es que la copigmentación se da de manera natural como mecanismo estabilizante de color en las

plantas ya que protege al catión flavilio de cualquier ataque nucleofílico de las moléculas de agua. El complejo formado entre el pigmento y el copigmento causó un efecto hiperacrómico y un desplazamiento batacrómico. Mientras el efecto hipocrómico significa un incremento en la intensidad del color, el desplazamiento batocrómico presenta desplazamiento de la longitud de onda máxima de absorbancia (Chen y Hrazdina, 1981; Mazza y Miniati, 1993). Un copigmento puede ser flavonoides, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos, polisacáridos, metales y las mismas antocianinas (Mazza y Brouillard, 1990). Podemos concluir que las moléculas usadas en el estudio fueron capaces de realizar copigmentación con las antocianinas, pero es claro que no se vieron los mismos efectos para los iones, azúcares y aminoácidos, las interacciones se dan de maneras distintas y no se comprenden aún los mecanismos que se presentan para que en ciertos casos se obtengan resultados positivos como con los aminoácidos. Lo que se debe tener en cuenta es que cuando la temperatura se incrementa causa una disociación entre el pigmento y copigmento resultando en compuesto sin color; debido a que el catión flavilio se vuelve más sensible a una hidratación obteniendo así el carbinol y chalcona (compuestos incoloros). Con el incremento de la temperatura, se da una competencia entre hidratación y copigmentación (Kopjar et al, 2009). Se pudo observar en este estudio que el complejo que se da entre antocianina-aminoácido es mucho más fuerte frente a una temperatura de 80°C que la que se dió entre antocianina-metal o antocianina-azúcar. Siendo estas dos últimas interacciones de las más sensibles a la hidratación del catión flavilio y perdiendo así el color en el extracto.

## VI. CONCLUSIONES

- En el estudio se determinó que las concentraciones usadas tanto de azúcares como de iones no lograron estabilizar a las antocianinas frente a la temperatura de pasteurización. Sin embargo, un 10,15 y 20% de sacarosa como un 0,025M tanto de calcio como de hierro mostraron que compartían el mismo rango que el blanco, es decir que se destruyeron la misma cantidad de antocianinas. Por otro lado, el uso de aminoácidos tuvo un efecto protector en el color de los extractos debido a la copigmentación que se da con dichos pigmentos. También se observó que el pH no es determinante en la estabilidad debido a que el mecanismo de copigmentación es el que tiene un mayor impacto.
- El proceso final de la extracción de antocianinas fue basado en el estudio realizado por Gorriti et al. (2009). Sin embargo se cambió un detalle y fue el no trabajar con pHs ajustados con HCl debido a que al realizar este paso se observaba que las antocianinas no se veían afectadas por la pasteurización.
- Se logró cuantificar el contenido de antocianinas de las dos variedades de maíz del Ecuador, teniendo un contenido significativamente menor que la variedad procedente del Perú. La variedad A contiene 4,66 mg/g de antocianinas y la B 3,27 mg/g de antocianinas
- El cuantificar las antocianinas antes y después de la pasteurización permitió obtener resultados acerca de si los extractos fueron perjudicados por la temperatura y cuál era el efecto que los azúcares, iones y aminoácidos sobre las antocianinas.

## VII. RECOMENDACIONES

- El análisis de contenido de antocianinas con el espectrofotómetro fue realizado una hora después que sobrepasaron la pasteurización. Se recomienda realizar más de una medición para el análisis de antocianinas después de la pasteurización.
- Se recomienda realizar un análisis de color tres horas después de la pasteurización, esto se debe a que algunos compuestos furfúricos se pueden formar pasada la primera hora después del calentamiento. Estos compuestos furfúricos generan color, por lo que es conveniente realizar otro análisis de antocianinas.
- Para futuros estudios, se deben utilizar más variables cambiando las concentraciones de las diferentes moléculas estabilizadoras para determinar si existen diferentes comportamientos de las antocianinas.
- Para el presente estudio se usaron dos tipos de azúcares a diferentes concentraciones, sin embargo, se puede recomendar otro tipo de azúcares ya sean sintéticos o no para ver si tienen algún efecto sobre las antocianinas del maíz morado.
- Se deberían utilizar otros iones metálicos como el magnesio y el potasio para determinar cuáles son los efectos sobre las antocianinas del maíz morado.
- Se deberían realizar más análisis de copigmentación con otros compuestos. Estos compuestos pueden ser ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido rosmarínico, polifenoles o polisacáridos que según la literatura, demuestran efectos benéficos sobre las antocianinas.
- Por facilidad y para obtener resultados más concisos se recomiendan a futuros estudios el uso de ciertos equipos. Por ejemplo, un espectrofotómetro que tenga la

capacidad de leer toda la longitud de onda con una sola medición de la muestra con el fin de obtener resultados más precisos y rápidos.

- Se recomienda también la implementación de columnas de destilación que pueden ayudar a una verdadera purificación de las antocianinas y utilizar un equipo HPLC para comprobar cuál es la antocianina de mayor cantidad dentro de la matriz alimentaria.
- Para futuros estudios se recomienda el uso de un equipo que pueda medir la turbidez de una solución, ya que las moléculas presentes en la misma podrían afectar la lectura del espectrofotómetro.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, A. (2003). *Efecto de la temperatura y un copigmento en la estabilidad de antocianinas de la col morada en una bebida*. Puebla, México.
- Adams JB. (1973). Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of cyanidin. I. In acidified aqueous solution at 100.deg. *J Sci Food Agric* 24: 747-762.
- Allinger et al. (1984). *Química Orgánica*. Editorial Reverté: España.
- Antal D.-S., Gârban G., Gârban Z. (2003) The anthocyanins: biologically active substances of food and pharmaceutical interest. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Food Technol.* 6: 106-115.
- Aoki, H., Kuze, N., and Kato, Y. (2002). Anthocyanins isolated from purple corn (zea mays L.). *Foods & Food Ingredients Journal of Japan* 199.
- Awika JM, Rooney LW, Waniska RD (2004). Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chem*; 90: 293-301.
- Baublis, A.J. and Berber-Jiménez, (1995). Structural and conformational characterization of a stable anthocyanin from *Tradescantia pallida*, *J. Agric. Food Chem.*, 43: 640–646.
- Beyer, W. (1987). *Manual de Química Orgánica*. Editorial Reverté: España.
- Bray, D., Alberts, B., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M. (2006). *Estructura y Función de las Proteínas. Introducción a la Biología Celular* (p. 119). Madrid: Ed. Médica Panamericana.
- Bridle P, Timberlake CF (1996). Anthocyanins as natural food colours – selected aspects. *Food Chem* 58: 103-109.
- Brouillard R. (1982). Chemical structure of anthocyanins. In: *Anthocyanins as Food Colors*. Pericles Markakis (ed.), *Academic Press Inc.*, New York, p.1-38.
- Calvi JP, Francis FJ (1978) *J Food Sci* 43:1448–1456
- Cane, B y Sellwood, J. (1994). *Química elemental Básica 2*. Reverté: Barcelona.
- Cao, S., Liu, L., Lu, Q., Xu, Y., Pan, S., & Wang, K. (2009). Integrated effects of ascorbic acid, flavonoids and sugars on thermal degradation of anthocyanins in blood orange juice. *European Food Research and Technology*, 228(6), 975-983.
- Castañeda, A., Galan, C., Pacheco, M., (2006). *Evaluación del contenido de metales y su efecto en la estabilidad de antocianinas extraídas del maíz criollo azul*. Memorias in extenso XX Congreso Nacional de Química Analítica. Mexico

- Causse, Céline. (2010). *Los Secretos De Salud De Los Antioxidantes: Más Joven Durante Más Tiempo*. Barcelona, España: Hispano Europea, 15-16.
- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., & Meireles, M. A. (2011). Non-thermal Stabilization Mechanisms Of Anthocyanins In Model And Food Systems—An Overview. *Food Research International*, 44(2), 499-509.
- Cevallos-Casal, B.A y Cisneros-Zevallos, L. (2003). Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. Department of Horticultural Sciences. *Elsevier*.
- Chang, R., Herranz, R., Reza, J. C., & Bourneville, E. (2007). *Fosfato de Calcio*. Química (9a ed., pp. 736, 912). México: McGraw-Hill/Interamericana.
- Chen, L.J., Hrazdina, G. (1981): *Structural aspects of anthocyanin-flavonoid complex formation and its role in plant colour*, *Phytochem.* 20 (2), 297-303.
- Cuevas Montilla, E., Antezana, A., & Winterhalter, P. (2008). *Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz (Zea mays) boliviano*. Alemania.
- Dai J.; Mumper R.J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313-7352
- Davies, A. J y Mazza, G. (1993). Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
- De Ancos B, Cano MP, Hernandez A, Monreal M. (1999). Effects of microwave heating on pigment composition and color of fruit purees. *J Sci Food Agric* 79: 663-670.
- Delgado-Vargas F., Paredes-López O. (2003). *Anthocyanins and betalains*. In *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*. (pp. 167-219) CRC Press, Boca Raton.
- Delpech R. (2000). The Importance of Red Pigments to Plant Life: experiments with anthocyanins. *Journal of Biological Education*, 34(4): 206-210.
- Díaz, N., Jorrín, J., & Barcena, J. (2005). *Reacciones coloreadas para la determinación cualitativa de azúcares*. Universidad de Córdoba: Argentina, 20, 1-7.
- Distribuidora de Químicos Industriales S.A. (s.f.). *Sulfato Ferroso Monohidratado*. Extraído el 19 de septiembre del 2014 desde: <http://69.167.133.98/~dqisaco/pdf/SULFATO%20FERROSO%20MONOHIDRATADO.pdf>
- Dröge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95.
- Dyrby, M., N. Westergaard and H. Stapelfeldt, (2001). Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chem.*, 72: 431-437.

- Ersus, S. and U. Yurdagel. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering* 80(3): 805-812.
- Fennema, O. R. (2000). *Química de los alimentos*. Segunda Edición. Editorial Acribia. Zaragoza – España.
- Fossen, T., Cabrita, L., & Andersen, M. (1998). Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry*, 64(4), 435-440.
- Francis J. F. (2000). *Phenolic compounds*. Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology. John Wiley and Sons, Inc. p. 376, 1872.
- Friedman, M. (1997). Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 45, n. 5, p. 1523-1540.
- García-Alonso M, Rimbach G, Rivas-Gonzalo JC, De Pascual-Teresa S. (2004). Antioxidant and cellular activities of anthocyanins and their corresponding vitisins A. Studies in platelets, monocytes, and human endothelial cells. *J Agric Food Chem* 52: 3378-3384.
- García-Palazon A, Suthanthangjai W, Kajda P, Zabetakis I. (2004). The effects of high hydrostatic pressure on b-glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria \* ananassa*). *Food Chem* 88: 7-10.
- Ghosh D, Konishi T (2007). Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pac J Clin Nutr* 16: 200-208.
- Giusti MM, Wroslad RE (2001). *Characterization and measurements of anthocyanins by UV-VIS spectroscopy*. In Current protocols in Food Analytical Chemistry (pp 13) 2001, New York: John Wiley & Sons, Inc. (Unit F1.2.1-F1.2.13).
- Giusti MM, Wroslad RE (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochem Eng J* 14: 217-225.
- Gómez, J; Caro, P; Sánchez, I; Naudi, A; Jove, M; Portero-Otin, M; López-Torres, M; Pamplona, R; Barja, G (2009). "Effect of methionine dietary supplementation on mitochondrial oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver and heart". *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 41 (3): 309–21.
- González-Manzano, S., Santos-Buelga, C., Dueñas-Patón, M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano, M. T. (2008). Colour implications of self-association processes of wine anthocyanins. *European Food Research and Technology*, 226, 483–490.
- Gorriti, A et al. (2009). *Extracción de antocianinas de las corontas de Zea mays L. "Maiz Morado"*. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.
- Harris, D. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. Reverté: Barcelona.

- Horbowicz M., Kosson R., Grzesiuk A, Dębski H (2008). *Anthocyanins of fruits and vegetables-their occurrence, analysis and role in human nutrition*. *Veget. Crops Res. Bull.* 68: 5-22.
- Hubberman, E, Heins, A, Stockmann, H y Schwarz, K. (2005). Influence of acids, salt, sugars and hydrocolloids on the colour stability of anthocyanin rich black currant and elderberry concentrates. *Eur Food Res Technology*.
- INIAP. (2011). *Manual de Capacitación para el cultivo de maíz suave*. Quito, Ecuador: Programa de Maíz.
- Justiniano, E. (2010). *Fenología e intensidad de color en corontas del maíz morado en sus diferentes estados de desarrollo en la localidad de la molina*. Universidad Nacional Agraria la Molina.
- Kallio, H., Pallasaho, S., Karppa, J., Linko, R. (1986). Comparison of the Half-Lives of the Anthocyanins in the Juice of Crowberry, *Empetrum nigrum*. *J Food Sci* 51:2 pp.408-410.
- Kalt W, Forney CF, Martin A, Prior RL. (1999). Antioxidant Capacity, Vitamin C, Phenolics, and Anthocyanins after Fresh Storage of Small Fruits. *J Agric Food Chem* 47:4638-44.
- Kay C (2004). *Analysis of the bioactivity, metabolism, and pharmacokinetics of anthocyanins in humans*. PhD thesis. University of Guelph, Ontario, Canada, pp. 1-9.
- Keith ES, Powers JJ. (1965). Polarographic measurement and thermal decomposition of anthocyanin compounds. *J Agric Food Chem* 13: 577-579.
- Konczak I, Zhang W (2004). Anthocyanins – more than nature’s colours. *J Biomed Biotechnol* 5: 239-240.
- Kopjar, M y Pilizota, V. (2009). Prevention of termal degradation of red currant juice anthocyanins by phenolic compounds addition. *Food Science Technology*.
- Kopjar. M y Pilizota, V. (2011). Prevention of thermal degradation of anthocyanins in blackberry juice with addition of different sugars. *Taylor & Francis: Journal of Food*.
- Kunsági-Máté, S., Stampel, E., Kollár, L., & Pour Nikfardjam, M. S. (2008). The effect of the oxidation state of iron ions on the competitive complexation of malvidin by caffeic or ellagic acid. *Food Research International*, 41, 693–696.
- Lê KA, Tappy L. (2006), *Metabolic effects of fructose*. *Curr Opin Nutr Metab Care* 9:469-475.
- León, K., Mery, D., Pedreschi, F., & León, J. (2006). Color measurement in L\*a\*b\* units from RGB digital images. *Food Research International*, 39(10), 1084-1091.
- Li, Y., Meng, X., Zhou, Y. (2009). Effects of Metal Ions and Food Additives on Stability of Anthocyanins from Blueberry. *Food Science Journal* 30:9
- Ma J, Li Y, Li J, et al (2000). Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J Agric Food Chem* 48: 5220- 5225.

- Madene, A., J. Scher, and S. Desobry. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - a review. *International Journal of Food Science and Technology* 4(1):1-21, 2006.
- Markakis P. (1982). *Stability of anthocyanins in foods*. In: Anthocyanins as Food Colors. Markakis P (ed.), Academic Press Inc., New York, p.163-178.
- Mayorga, V. (2010). *Estudio de las propiedades reológicas y funcionales del maíz nativo "Racimo de uva" (Zea mays. L)*. Universidad Técnica de Ambato - Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Ambato, Ecuador.
- Mazza G, Brouillard R. (1987). Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem* 25: 207-225.
- Mazza G. and Miniati E. (1993). Introduction. Ch. 1 in anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. En: Anthocyanin Pigment Composition of Red-fleshed Potatoes (L. E. Rodriguez-Saona, M. M. Giusti and R. E. Wrolstad, eds.), *J. Food Sci.*, 63(3): 458-465.
- Mazza, G., Brouillard, R. (1990): *The mechanism of copigmentation of anthocyanins in aqueous solutions*, *Phytochem.* 29, 1097-1102.
- Mazza, G.; Miniati, E (1993). *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*; CRC Press: Boca Raton, FL, 362 pp.
- Melo, V y Cuamatzi, O. (2006). *Bioquímica de los procesos metabólicos*. Reverté: Mexico D.F.
- Miguel M.G (2010). *Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants*. A review. *Flavour Fragr. J.* 25: 291-312.
- Miguel, M. (2011). Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities . *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 06(01), 7-15.
- Miñano, A., Chico, J., López, E., Sisniegas, M., & Bobadilla, M. (2004). *Efecto de la concentración de sacarosa en la producción de antocianinas a partir de cultivos celulares de Vitis vinifera L. var. red globe*. *Rev. Peru. Biol*, 2(11), 187-192.
- Moreno, M, Vilorio, A, Lopez, E y Douglas, B. (2002). *Estabilidad de antocianinas en jugos pasteurizados de mora (Rubus glaucus Benth)*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*.
- Nakatani, N., Fukuda, H., and Fuwa, H. (1979). *Major anthocyanin of Bolivian purple corn (Zea mays L.)*. *Agricultural and biological chemistry* 43, 389-391.
- Nikkhah, E, Khayami, M. (2007). Effect of sugar treatment on stability of anthocyanin pigments in berries. *Journal of Biological Sciences*.
- Nikkhah E., Khayami M., Heidari R (2008). *In vitro screening for antioxidant activity and cancer suppressive effect on blackberry (Morus nigra)*. *Iran. J Canc. Prevent.* 1: 167-172.

- Olaya, C., Castaño, M., & Garzón, G. (2009). Efecto de la temperatura, almacenamiento y la actividad de agua sobre la estabilidad de antocianinas de *Rubus glaucus* y *Solanum betaceum* Cav. dark-red strain. *Acta Biológica Colombiana*, 14(3), 143-158.
- Palamidis N, Markakis P. (1978). *Stability of grape anthocyanin in carbonated beverages*. *Semana Vitivinicola* 33: 2633, 2635, 2637-2639.
- Palzer, S. (2009). Review: Food structures for nutrition, health and wellness. *Trends in Food Science and Technology* 20(5): 194-200.
- Parra, R. (2011). *Revision: Microencapsulación de Alimentos*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Básicas.
- Pérez, R, Hernández, L, Madrigal, L et al. (2010). *Evaluación de antocianinas de la zarzamora en fruta y en conserva*. Universidad de Guanajuato. XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Prior, R. L (2004). *Absorption and metabolism of anthocyanins: potential health effects*. In *Phytochemicals: Mechanisms of Action*; Meskin, M., Bidlack, W. R., Davies, A. J., Lewis, D. S., Randolph, R. K., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, pp 1-19.
- Rebolledo, P. (2007). Determinación del Potencial de Coloración en Alimentos de un Concentrado de Jugo de Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) Obtenido por Nanofiltración. Extraído el 19 de diciembre del 2014: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/far292d/doc/far292d.pdf>
- Rein, M. (2006). *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*. Academic Dissertation. University of Helsinki. Helsinki
- Ritz, E., Hahn, K., Ketteler, M., Kuhlmann, M., & Mann, J. (2012). *Phosphate Additives in Food—a Health Risk*. *Dtsch Arztebl Int.*, 109(4), 49-55.
- Riveros, M., Parada, A., & Pettinelli, P. (2014). *Consumo de fructosa y sus implicaciones para la salud; malabsorción de fructosa e hígado graso no alcohólico*. (Spanish). *Nutrición Hospitalaria*, 29(3), 491-499. doi:10.3305/NH.2014.29.3.7178
- Rubinskiene, M., Viskelis, P., Jasutiene, I., Viskeliene, R., & Bobinas, C. (2005). Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. *Food Research International*, 38(8-9), 867-871.
- Saito, N., Ku, M., Tatsuzawa, F., Lu, T. S., Yokoi, M., Shigihara, A., and Honda, T. (1995) *Acylated cyanidin glycosides in the purple-red flowers of Bletilla striata*, *Phytochemistry*, 40: 1521–1529.
- Salinas M. Y, Rubio H. D. y Díaz V. A. (2005). *Extracción y Uso de Pigmentos del Grano de Maíz (Zea mays I) Como Colorantes en Yogur*. *ALAN.*, 55(3).
- Shi, Y. (2009). *Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure*. *Cell*, 139(3), 468-484.

- Shipp, J., & Abdel-Aal, E. M. (2010). Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *The Open Food Science Journal*, 4(1), 7-22.
- Sierra exportadora. (2013). *Perfil Comercial: Antocianina de Maíz Morado*. Extraído el 17 de abril del 2014 desde: [http://www.sierraexportadora.gob.pe/perfil\\_comercial/ANTOCIANINA%20DE%20MAIZ%20MORADO.pdf](http://www.sierraexportadora.gob.pe/perfil_comercial/ANTOCIANINA%20DE%20MAIZ%20MORADO.pdf)
- Silva, J. (2008). *Con Ustedes, su majestad, el Maíz Morado*. Agro enfoque.
- Skrede G, Wrolstad RE, Durst RW. (2000). Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *J Food Sci* 65: 357-364.
- Solid Perú. (2007). *Conociendo la cadena productiva del maíz morado en Ayacucho*. Extraído el 17 de abril del 2014 desde: <http://www.solidinternational.ch/wp-content/themes/solid/sources/img/Conociendo-la-cadena-productiva-del-maiz-morado-en-Ayacucho11.pdf>
- Sordo, J. (2004). *Papel Antioxidante de Antocianinas presentes en la Col Morada (Brassica oleracea), en Sistemas Oxidantes de FeCl3/Ac. Ascórbico en la Peroxidación del Ácido Linoleico*. Tesis Licenciatura. Quimicofarmacobiología. Departamento de Química y Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de las Américas Puebla.
- Starr, MS., Francis FJ. (1974). Effect of metallic ions on color and pigment content of cranberry juice cocktail. *J Food Sci* 38:1043-6.
- Starr, C., & Taggart, R. (2008). *Proteínas. Biología: La Unidad y la Diversidad de la Vida* (p. 42). México D.F: Thomson.
- Stintzing FC, Carle R (2004). Functional properties of anthocyanins and betalins in plants, food, and in human nutrition. *Trends Food Sci Technol* 15: 19-38.
- Stintzing FC, Stintzing AS, Carle R, Frei B, Wrolstad RE (2002). Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *J Agric Food Chem* 50: 6172-6180.
- Strack D. and Wray V. (1994). *The anthocyanins*. Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology (J. F. Francis ed.), John Wiley and Sons, Inc. p. 1872.
- Styles, E. D., and Ceska, O. (1972). *Flavonoid pigments in genetic strains of maize*. *Phytochemistry* 11, 3019-3021.
- Sui, X, Dong, X y Zhou, W. (2014). *Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of two anthocyanins in aqueous solution*. Food Chemistry.

- Tachibana, N, Kimura, Y y Ohno, T. (2013). *Examination of molecular mechanism for the enhance thermal stability of anthocyanins by metal cations and polysaccharides*. Food Chemistry.
- Thomas, M. J. (2000). *The role of free radicals and antioxidants*. Nutrition, v. 16, n. 7-8, p. 716-718, 2000.
- Thorngate, J. H., and Singleton, V. L. (1994). Reactions of monomeric and polymeric flavan-3-ols with monomeric pigment in model wine solutions. *American Journal of Enology and Viticulture* 45, 349-352.
- Tsai, P. J., Delva, L., Yu, T. Y., Huang, Y. T., & Dufosse, L. (2005). Effect of sucrose on the anthocyanin and antioxidant capacity of mulberry extract during high temperature heating. *Food Research International*, 38, 1059–1065.
- Walford, J. (1980). *Historical development of food coloration*. Developments in Food colours.
- Wang SY, Stretch AW. 2001. Antioxidant capacity in cranberry is influenced by cultivar and storage temperature. *J Agric Food Chem* 49: 969-974.
- Wang, H., Cao, G., & Prior, R. L. (1997). Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(2), 304-309.
- Wardlaw, G. M., Hampl, J. S., & DiSilvestro, R. A. (2005). *Proteínas*. Perspectivas en Nutrición (pp. 295-299). México: McGraw-Hill Interamericana.
- Whiting, S. (2002). Dietary protein, phosphorus and potassium are beneficial to bone mineral density in adult men consuming adequate dietary calcium. *Journal of the American College of Nutrition*, 21, 409.
- Willig, J. A. (2009). *The effect of anthocyanin acylation on the inhibition of HT-29 colon cancer cell proliferation*. Columbus, Ohio: Ohio State University
- Wrolstad RE, Erlandson JA. (1973). Effect of metal ions on the color of strawberry puree. *J Food Sci* 38: 460-463.
- Wrolstad RE, Skrede G, Lea P, Enersen G. (1990). Influence of sugar on anthocyanin pigment stability in frozen strawberries. *J Food Sci* 55: 1064-1065, 1072.
- Wrolstad, R. E (2004). Anthocyanin pigments bioactivity and coloring properties. *J. Food Sci.* 69, C419-C421.
- Wu, X., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Prior, R. (2006). Concentrations of anthocyanins in common food in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, pp. 4069-4075
- Yaipén, R. (2013). *Exportación de maíz morado creció 35% en el 2012*. Extraído el 17 de abril del 2014 desde: <http://www.agronegocios.pe/estadisticas/item/118-exportaciones-de-ma%C3%ADz-morado-creci%C3%B3-35-en-el-2012>

- Yang Z, Fan G, Gu Z, Han Y, Chen Z. (2007). Optimization extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob using tristimulus colorimetry. *Eur Food Res Technol* DOI 10.1007/S 00217-007-0735-4: Springer-Verlag.
- Yañez, J., J. Salazar, L. Chaires, J. Jimenez, M. Marquez y E. Ramos. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Revista Avance y Perspectiva* 21: 313-319.
- Yao, H., Zeng, Q., Lao, Y., Liu, S., Hu, W., (2006). Effects of Food Additives on the Stability of Litchi Anthocyanin. *Food Science Journal*
- Yokotsuka K, Singleton VL. (1997). Disappearance of anthocyanins as grape juice is prepared and oxidized with PPO and PPO substrates. *Am J Enol Vitic* 48: 13-25.
- Zambrano, J., Rojas Sarmiento, H., Borda Guerra, G., Hastamorir Caro, A., & Medina Riaño, M. (2011). Estabilidad de antocianinas en jugo y concentrado de agraz (*vaccinium meridionale sw.*). *Revista Facultad Nacional De Agronomía Medellín*. Retrieved from <http://www.revistas.unal.edu.co/ojs/index.php/refame/article/view/26411/37142>
- Zapata, K, Cortes, F, & Rojano, B. (2013). Polifenoles y Actividad Antioxidante del Fruto de Guayaba Agria (*Psidium araca*). *Información tecnológica*, 24(5), 103-112. Recuperado en 20 de diciembre de 2014, de [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-07642013000500012&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642013000500012&lng=es&tlng=es). 10.4067/S0718-07642013000500012.

## IX. ÍNDICE

### A

aminoácidos, 8, 9, 12, 40, 41, 42, 43, 45, 56, 57, 58, 59, 60  
 antioxidante, 14, 19, 23, 25, 42  
 antocianidina,, 20  
**antocianinas**, 1, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 38, 39, 41, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 93, 94, 97, 98, 99  
 azúcares, 9, 10, 12, 13, 35, 48, 59, 60, 64, 75, 79

### B

batocrómico, 32, 59

### C

Cianidina, 21, 23  
 cianidina 3-glucosido, 26  
 colorantes, 12, 15, 16, 25, 26, 30, 34  
 copigmentación, 13, 32, 33, 40, 41, 56, 57, 59, 60, 62

### D

degradación, 25, 28, 29, 30, 35, 50

### E

Ecuador, 3, 7, 12, 16, 19, 43, 46, 47, 48, 61, 65, 66  
 espectrofotómetro, 44, 45, 48, 57, 61, 62  
 estructura, 20, 24, 28, 33, 36, 37, 40, 41, 48

### H

hipercrómico, 32, 51, 57, 59

### I

iones, 9, 10, 12, 13, 26, 38, 39, 43, 46, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 60, 62, 80, 84, 94

### M

**maíz morado**, 1, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 23, 33, 34, 35, 37, 39, 43, 44, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 58, 62, 65, 68, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 88  
 microencapsulación, 31, 56, 70

### P

**pasteurización**, 1, 9, 10, 11, 12, 44, 45, 48, 49, 51, 52, 53, 55, 57, 58, 60, 61, 79, 84, 86, 99  
 pH, 8, 9, 10, 12, 13, 25, 26, 27, 29, 44, 45, 46, 47, 51, 52, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 64, 69, 79, 88, 89

## X. ANEXOS / APÉNDICES

### ANEXO 1. MAÍZ MORADO COMO INGREDIENTE

<b>TABLA 15 PAISES QUE LISTAN AL MAÍZ MORADO COMO INGREDIENTE</b>		
<b>País</b>	<b>Número de Variantes</b>	<b>Número de Variante (%)</b>
<b>Taiwán</b>	1	2,50%
<b>Perú</b>	1	2,50%
<b>Perú</b>	1	2,50%
<b>Venezuela</b>	2	5,00%
<b>Japón</b>	6	15,00%
<b>South Corea</b>	1	2,50%
<b>China</b>	1	2,50%
<b>EE UU</b>	1	2,50%
<b>China</b>	1	2,50%
<b>China</b>	1	2,50%
<b>India</b>	1	2,50%
<b>Filipinas</b>	1	2,50%
<b>Singapur</b>	1	2,50%
<b>Brasil</b>	1	2,50%
<b>Japón</b>	1	2,50%
<b>Japón</b>	1	2,50%
<b>EE UU</b>	3	7,50%
<b>España</b>	1	2,50%
<b>Japón</b>	1	2,50%
<b>Japón</b>	1	2,50%
<b>Japón</b>	1	2,50%
<b>Venezuela</b>	1	2,50%
<b>Perú</b>	1	2,50%
<b>EE UU</b>	1	2,50%
<b>Japón</b>	1	2,50%

<b>TABLA 16 CATEGORÍAS QUE LISTAN MAÍZ MORADO COMO INGREDIENTE</b>		
<b>Categoría</b>	<b>Número de Variantes</b>	<b>Número de Variantes (%)</b>
<b>Cereales para Desayuno</b>	1	2,50%
<b>Chocolates</b>	1	2,50%
<b>Lácteos</b>	3	7,50%
<b>Postres y Helados</b>	3	7,50%
<b>Frutas y Vegetales</b>	1	2,50%
<b>Jugos</b>	3	7,50%
<b>Comidas para Cenas y Almuerzos</b>	1	2,50%
<b>Otras Bebidas</b>	1	2,50%
<b>Guarniciones</b>	3	7,50%
<b>Snacks</b>	5	12,50%
<b>Confites</b>	18	45,00%
	<b>40</b>	<b>100,00%</b>

<b>TABLA 17 COMPAÑÍAS QUE LISTAN AL MAÍZ MORADO COMO INGREDIENTE</b>		
<b>Compañía</b>	<b>Número de Variantes</b>	<b>Números de Variantes (%)</b>
Axiom Foods	1	2,50%
Bodegas Peru	1	2,50%
Coexpra	2	5,00%
FamilyMart	1	2,50%
Furuta Confectionery	9	22,50%
Gloria	1	2,50%
Haitai Confectionery & Foods	1	2,50%
Hongsheng	1	2,50%
Ju Le Food	1	2,50%
La Cosecha Peruana	1	2,50%
Marukawa	1	2,50%
McCleary	2	5,00%
Meiji	2	5,00%
Morinaga	2	5,00%
Naturandina America Import	1	2,50%
Nestlé	1	2,50%
Novel Seika	2	5,00%
P&D Andina Alimentos	1	2,50%
Peruvian Import Company	1	2,50%
Sakuma Confectionery	1	2,50%
Sansei Foods	1	2,50%
Sasaki Confectionery	1	2,50%
Simply-Originals	1	2,50%
Tat Hui Foods	4	10,00%
<b>Muestra Total</b>	<b>40</b>	<b>100,00%</b>

## ANEXO 2. EXTRACTO DE MAÍZ MORADO COMO INGREDIENTE

<b>TABLA 18 PAÍSES QUE LISTAN AL EXTRACTO DE MAÍZ MORADO COMO INGREDIENTE</b>		
<b>País</b>	<b>Número de Variantes</b>	<b>Numero de Variantes (%)</b>
China	1	0,83%
Hong Kong	3	2,48%
Japan	111	91,74%
Netherlands	1	0,83%
Singapore	1	0,83%
South Korea	1	0,83%
USA	3	2,48%
<b>Muestra Total</b>	<b>121</b>	<b>100,00%</b>

<b>TABLA 19 CATEGORÍAS EN LOS QUE USAN EXTRACTO DE MAÍZ MORADO</b>		
<b>Categoría</b>	<b>Numero de Variantes</b>	<b>Numero de Variantes (%)</b>
Bebidas Alcohólicas	2	1,65%
Panadería y Pastelería	2	1,65%
Chocolates	3	2,48%
Lácteos	2	1,65%
Postres y Helados	17	14,05%
Jugos	7	5,79%
Snacks	53	43,80%
Confites	35	28,93%
	<b>121</b>	<b>100,00%</b>

<b>TABLA 20 COMPAÑÍAS QUE UTILIZAN EXTRACTO DE MAÍZ MORADO COMO INGREDIENTE</b>		
<b>Compañía</b>	<b>Numero de Variantes</b>	<b>Numero de Variantes (%)</b>
Adina for Life	1	0,83%
Asahi Food & Healthcare	7	5,79%
Cadbury	2	1,65%
Calbee	1	0,83%
Calbee Foods	4	3,31%
Circle K Sunkus	1	0,83%
City Super	1	0,83%
DHC	1	0,83%
Ezaki Glico	1	0,83%
FamilyMart	4	3,31%
Frente International	1	0,83%
Frito-Lay	2	1,65%
Furuta Confectionery	6	4,96%
Haitai Confectionery & Foods	1	0,83%
InSpiral	1	0,83%
Kabaya Foods	9	7,44%
Kanro	2	1,65%
Koikeya	25	20,66%
LB	1	0,83%
Lotte	5	4,13%
Lotte Ice Cream	4	3,31%
Marukawa Confectionery	1	0,83%
Meiji	4	3,31%
Mitsuboshi Shokuhin	2	1,65%
Morinaga	2	1,65%
Morinaga Milk Industry	2	1,65%
Muji	1	0,83%
Nestlé	2	1,65%
Ohayo Dairy Products	6	4,96%
Otsuka Foods	1	0,83%
ProBar	1	0,83%
Seven & I Holdings	1	0,83%
Shikishima Baking	1	0,83%
Suntory	2	1,65%
The Varas Group	1	0,83%
Tohato	14	11,57%

### ANEXO 3. ALIMENTOS QUE CONTIENEN ANTOCIANINAS

Frutas	Vegetales	Frutas Secas	Especias
Aguacate	Alverjas	Almendras	Ajo
Albaricoque	Alcachofa	Anacardos	Albahaca
Arándano	Apio	Avellana	Canela
Banana	Berenjena	Macadamia	Clavos
Cantalupo	Brócoli	Maní	Cúrcuma
Cerezas	Camote	Nueces	Curry
Ciruelas	Cebolla Roja	Nuez de Brasil	Jengibre
Durazno	Col	Piñones	Mostaza
Frambuesa	Coliflor	Pistachos	Orégano
Fresa	Esparrago		Paprika
Grosella	Espinaca	Ciruelas pasas	Perejil
Grosellero negro	Frejol Negro	Higos	Pimienta
Grosellero rojo	Frejol Pinto	Pasas	Polvo de chile
Kiwi	Frejol Rojo		Semillas Poppy
Mandarina	Lechuga		
Mango	Maíz Morado		
Manzana	Papa		
Mielada	Pepino		
Mora	Pimiento		
Nectarina	Rábano		
Peras	Remolacha		
Piña	Tomate		
Sandia	Zanahoria		
Saúco			
Uvas			

FUENTE: WAO ET AL., 2006

#### ANEXO 4. RESULTADOS ANÁLISIS DE TRES VARIEDADES DE MAÍZ MORADO

TABLA 21 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LAS VARIEDADES A, B Y C DE MAÍZ MORADO.					
VARIEDAD A		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,025	0,001	0,029	6,05334572
	CH3	0,008	0,013		
2	KCL	0,023	0,002	0,026	5,42713755
	CH3	0,009	0,014		
3	KCL	0,026	0,002	0,028	5,84460967
	CH3	0,018	0,022		
4	KCL	0,023	0,004	0,016	3,33977695
	CH3	0,004	0,001		
5	KCL	0,03	0,007	0,016	3,33977695
	CH3	0,013	0,006		
6	KCL	0,034	0,012	0,02	4,17472119
	CH3	0,013	0,011		

VARIEDAD B		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,02	0,002	0,018	3,75724907
	CH3	0,007	0,007		
2	KCL	0,021	0,001	0,017	3,54851301
	CH3	0,003	0		
3	KCL	0,022	0,001	0,019	3,96598513
	CH3	0,004	0,002		
4	KCL	0,021	0,002	0,013	2,71356877
	CH3	0,007	0,001		
5	KCL	0,018	0,001	0,013	2,71356877
	CH3	0,005	0,001		
6	KCL	0,02	0,005	0,014	2,92230483
	CH3	0,004	0,003		

VARIEDAD C		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,089	0,001	0,088	18,3687732
	CH3	0,01	0,01		
2	KCL	0,1	0,005	0,078	16,2814126
	CH3	0,018	0,001		
3	KCL	0,104	0,006	0,095	19,8299257
	CH3	0,005	0,002		
4	KCL	0,113	0,005	0,091	18,9949814
	CH3	0,02	0,003		
5	KCL	0,106	0,005	0,084	17,533829
	CH3	0,021	0,004		
5	KCL	0,1	0,007	0,083	17,3250929
	CH3	0,02	0,01		

<b>TABLA 22 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LAS VARIEDADES A, B Y C DE MAÍZ MORADO.</b>								
	Repeticiones							
Tratamiento	I	II	III	IV	V	VI	SUM	PROM
A	6,05334572	5,21840149	5,84460967	3,33977695	3,33977695	4,17472119	27,970632	4,661772
B	3,75724907	3,54851301	3,96598513	2,71356877	2,71356877	2,92230483	19,6211896	3,27019827
C	18,3687732	16,2814126	19,8299257	18,9949814	17,533829	17,3250929	108,334015	18,0556691

## ANEXO 5. RESULTADOS ANÁLISIS UTILIZANDO DIFERENTES AZÚCARES

**TABLA 23 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CUANDO SE LES AÑADE 10, 15 O 20% DE SACAROSA.**

SACAROSA 10%		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,05	0,018	0,017	3,54851301
	CH3	0,031	0,016		
2	KCL	0,046	0,015	0,018	3,75724907
	CH3	0,03	0,017		
3	KCL	0,12	0,058	0,024	5,00966543
	CH3	0,094	0,056		
4	KCL	0,138	0,064	0,026	5,42713755
	CH3	0,108	0,06		

SACAROSA 15%		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,051	0,019	0,02	4,17472119
	CH3	0,027	0,015		
2	KCL	0,049	0,018	0,015	3,13104089
	CH3	0,036	0,02		
3	KCL	0,11	0,05	0,022	4,59219331
	CH3	0,092	0,054		
4	KCL	0,123	0,055	0,026	5,42713755
	CH3	0,098	0,056		

SACAROSA 20%		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,05	0,016	0,018	3,75724907
	CH3	0,039	0,023		
2	KCL	0,056	0,02	0,02	4,17472119
	CH3	0,037	0,021		
3	KCL	0,105	0,045	0,024	5,00966543
	CH3	0,079	0,043		
4	KCL	0,115	0,052	0,025	5,21840149
	CH3	0,092	0,054		

BLANCO		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,047	0,014	0,021	4,38345725
	CH3	0,028	0,016		
2	KCL	0,133	0,063	0,031	6,47081784
	CH3	0,103	0,064		
3	KCL	0,098	0,039	0,021	4,38345725
	CH3	0,085	0,047		
4	KCL	0,096	0,038	0,02	4,17472119
	CH3	0,081	0,043		

**TABLA 24 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CON 10, 15 O 20% DE SACAROSA DESPUÉS DE PASTEURIZAR.**

SACAROSA 10%		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,037	0,013	0,011	2,29609665
	CH3	0,034	0,021		
2	KCL	0,044	0,017	0,016	3,33977695
	CH3	0,028	0,017		
3	KCL	0,079	0,034	0,018	3,75724907
	CH3	0,067	0,04		
4	KCL	0,081	0,028	0,019	3,96598513
	CH3	0,077	0,043		

SACAROSA 15%		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,045	0,015	0,018	3,75724907
	CH3	0,031	0,019		
2	KCL	0,05	0,025	0,014	2,92230483
	CH3	0,033	0,022		
3	KCL	0,069	0,023	0,019	3,96598513
	CH3	0,063	0,036		
4	KCL	0,068	0,018	0,02	4,17472119
	CH3	0,068	0,038		

SACAROSA 20%		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,046	0,02	0,012	2,50483271
	CH3	0,032	0,018		
2	KCL	0,04	0,016	0,013	2,71356877
	CH3	0,028	0,017		
3	KCL	0,053	0,015	0,019	3,96598513
	CH3	0,05	0,031		
4	KCL	0,068	0,016	0,02	4,17472119
	CH3	0,067	0,035		

BLANCO		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,046	0,012	0,016	3,33977695
	CH3	0,039	0,021		
2	KCL	0,12	0,056	0,024	5,00966543
	CH3	0,097	0,057		
3	KCL	0,096	0,042	0,02	4,17472119
	CH3	0,079	0,045		
4	KCL	0,089	0,038	0,019	3,96598513
	CH3	0,074	0,042		

**TABLA 25 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CUANDO SE LES AÑADE 10, 15 O 20% DE FRUCTOSA.**

FRUCTOSA 10%		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,124	0,058	0,026	5,42713755
	CH3	0,1	0,06		
2	KCL	0,084	0,033	0,022	4,59219331
	CH3	0,074	0,045		
3	KCL	0,095	0,036	0,027	5,63587361
	CH3	0,074	0,042		
4	KCL	0,114	0,051	0,024	5,00966543
	CH3	0,091	0,052		

FRUCTOSA 15%		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,112	0,052	0,023	4,80092937
	CH3	0,09	0,053		
2	KCL	0,111	0,05	0,021	4,38345725
	CH3	0,096	0,056		
3	KCL	0,097	0,039	0,022	4,59219331
	CH3	0,08	0,044		
4	KCL	0,119	0,054	0,03	6,26208178
	CH3	0,08	0,045		

FRUCTOSA 20%		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,093	0,036	0,024	5,00966543
	CH3	0,082	0,049		
2	KCL	0,123	0,056	0,03	6,26208178
	CH3	0,091	0,054		
3	KCL	0,083	0,029	0,024	5,00966543
	CH3	0,067	0,037		
4	KCL	0,125	0,053	0,031	6,47081784
	CH3	0,101	0,06		

BLANCO		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,112	0,052	0,023	4,80092937
	CH3	0,09	0,053		
2	KCL	0,092	0,036	0,023	4,80092937
	CH3	0,076	0,043		
3	KCL	0,091	0,037	0,024	5,00966543
	CH3	0,074	0,044		
4	KCL	0,04	0,01	0,019	3,96598513
	CH3	0,025	0,014		

**TABLA 26 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CON 10, 15 O 20% DE FRUCTOSA DESPUÉS DE PASTEURIZAR.**

FRUCTOSA 10%		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,071	0,032	0,009	1,87862454
	CH3	0,072	0,042		
2	KCL	0,062	0,028	0,006	1,25241636
	CH3	0,068	0,04		
3	KCL	0,059	0,025	0,009	1,87862454
	CH3	0,056	0,031		
4	KCL	0,051	0,022	0,013	2,71356877
	CH3	0,076	0,06		

FRUCTOSA 15%		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,067	0,031	0,003	0,62620818
	CH3	0,079	0,046		
2	KCL	0,062	0,03	0,002	0,41747212
	CH3	0,08	0,05		
3	KCL	0,064	0,026	0,014	2,92230483
	CH3	0,057	0,033		
4	KCL	0,064	0,025	0,011	2,29609665
	CH3	0,066	0,038		

FRUCTOSA 20%		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,06	0,024	0,01	2,08736059
	CH3	0,064	0,038		
2	KCL	0,044	0,021	0,009	1,87862454
	CH3	0,059	0,045		
3	KCL	0,052	0,021	0,007	1,46115242
	CH3	0,051	0,027		
4	KCL	0,082	0,035	0,014	2,92230483
	CH3	0,076	0,043		

BLANCO		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,096	0,038	0,02	4,17472119
	CH3	0,081	0,043		
2	KCL	0,088	0,035	0,02	4,17472119
	CH3	0,071	0,038		
3	KCL	0,078	0,029	0,015	3,13104089
	CH3	0,07	0,036		
4	KCL	0,04	0,011	0,018	3,75724907
	CH3	0,026	0,015		

**TABLA 27 CANTIDAD DE ANTOCIANINAS QUE SE PERDIERON DE LOS EXTRACTOS DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN UTILIZANDO LOS DIFERENTES PORCENTAJES DE SACAROSA O FRUCTOSA.**

Tratamiento	Repeticiones		III	IV	SUM	PROM
	I	II				
10 SACAROSA	1,32378864	0,95784765	1,32378864	1,40041152	5,00583644	1,25145911
10 FRUCTOSA	2,0120917	1,95953488	2,06331022	1,6721533	7,7070901	1,92677253
15 SACAROSA	0,95784765	0,84186463	1,06122956	1,32378864	4,18473048	1,04618262
15 FRUCTOSA	2,16211036	2,11328775	1,47305413	2,11328775	7,86174	1,965435
20 SACAROSA	1,32378864	1,40041152	1,24244931	1,24244931	5,20909878	1,3022747
20 FRUCTOSA	1,84994725	2,20985458	2,0120917	2,0120917	8,08398523	2,02099631
BLANCO	1,15183944	1,23082054	1,19207182	0,84186463	4,41659643	1,10414911

**TABLA 28. VALORES DE PH PARA CADA MUESTRA UTILIZANDO DIFERENTES AZÚCARES**

SACAROSA 10%		Promedio		FRUCTOSA 10%		Promedio	
6,4	6,41	6,39	6,4	6,52	6,55	6,58	6,55
6,39	6,37	6,35	6,37	6,38	6,41	6,41	6,4
6,32	6,33	6,37	6,34	6,56	6,61	6,54	6,57
6,36	6,36	6,36	6,36	6,57	6,56	6,55	6,56
SACAROSA 15%		Promedio		FRUCTOSA 15%		Promedio	
6,2	6,22	6,15	6,19	6,5	6,58	6,57	6,55
6,22	6,25	6,16	6,21	6,48	6,51	6,54	6,51
6,18	6,18	6,18	6,18	6,44	6,36	6,4	6,4
6,25	6,18	6,17	6,2	6,51	6,47	6,37	6,45
SACAROSA 20%		Promedio		FRUCTOSA 20%		Promedio	
6,1	6,14	6,18	6,14	6,38	6,4	6,33	6,37
6,26	6,26	6,26	6,26	6,25	6,2	6,18	6,21
6,1	6,11	6,12	6,11	6,31	6,27	6,26	6,28
6,23	6,24	6,19	6,22	6,47	6,4	6,39	6,42
BLANCO		Promedio		Promedio		Promedio	
		6,56	6,62	6,59	6,59		
		6,63	6,7	6,65	6,66		
		6,6	6,65	6,58	6,61		
		6,58	6,6	6,59	6,59		

## ANEXO 6. RESULTADOS ANÁLISIS UTILIZANDO DIFERENTES IONES METÁLICOS

TABLA 29 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CUANDO SE AÑADEN 0,05M O 0,025M DE SULFATO FERROSO.					
Sulfato ferroso 0,05M		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,123	0,056	0,033	6,88828996
	CH3	0,083	0,049		
2	KCL	0,122	0,054	0,028	5,84460967
	CH3	0,1	0,06		
3	KCL	0,115	0,06	0,025	5,21840149
	CH3	0,08	0,05		
4	KCL	0,125	0,07	0,025	5,21840149
	CH3	0,08	0,05		
5	KCL	0,144	0,071	0,032	6,6795539
	CH3	0,093	0,052		

Sulfato ferroso 0,025M		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,094	0,041	0,021	4,38345725
	CH3	0,073	0,041		
2	KCL	0,099	0,038	0,022	4,59219331
	CH3	0,089	0,05		
3	KCL	0,1	0,042	0,015	3,13104089
	CH3	0,08	0,037		
4	KCL	0,098	0,045	0,019	3,96598513
	CH3	0,065	0,031		
5	KCL	0,115	0,047	0,025	5,21840149
	CH3	0,096	0,053		

BLANCO		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,095	0,038	0,021	4,38345725
	CH3	0,082	0,046		
2	KCL	0,1	0,04	0,02	4,17472119
	CH3	0,07	0,03		
3	KCL	0,132	0,058	0,029	6,05334572
	CH3	0,101	0,056		
4	KCL	0,091	0,032	0,018	3,75724907
	CH3	0,089	0,048		
5	KCL	0,1	0,04	0,019	3,96598513
	CH3	0,086	0,045		

**TABLA 30 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CON 0,05M O 0,025M DE SULFATO FERROSO DESPUÉS DE SER PASTEURIZADOS.**

Sulfato ferroso 0,05M		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,021	0,001	0,019	3,96598513
	CH3	0,003	0,002		
2	KCL	0,021	0,002	0,018	3,75724907
	CH3	0,002	0,001		
3	KCL	0,013	0	0,012	2,50483271
	CH3	0,004	0,003		
4	KCL	0,023	0,004	0,017	3,54851301
	CH3	0,002	0		
5	KCL	0,016	0	0,015	3,13104089
	CH3	0,002	0,001		

Sulfato ferroso 0,025M		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,02	0	0,018	3,75724907
	CH3	0,003	0,001		
2	KCL	0,018	0	0,018	3,75724907
	CH3	0,001	0,001		
3	KCL	0,014	0	0,013	2,71356877
	CH3	0,002	0,001		
4	KCL	0,02	0,001	0,016	3,33977695
	CH3	0,003	0		
5	KCL	0,022	0,001	0,02	4,17472119
	CH3	0,003	0,002		

BLANCO		510	700	A	antocianinas
1	KCL	0,085	0,034	0,019	3,96598513
	CH3	0,068	0,036		
2	KCL	0,078	0,03	0,016	3,33977695
	CH3	0,065	0,033		
3	KCL	0,115	0,05	0,026	5,42713755
	CH3	0,094	0,055		
4	KCL	0,107	0,043	0,014	2,92230483
	CH3	0,09	0,04		
5	KCL	0,1	0,033	0,012	2,50483271
	CH3	0,079	0,024		

**TABLA 31 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CUANDO SE AÑADEN 0,05M O 0,025M DE FOSFATO DE CALCIO.**

Fosfato de Ca 0,05M		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,122	0,051	0,027	5,63587361
	CH3	0,099	0,055		
2	KCL	0,045	0,019	0,018	3,75724907
	CH3	0,039	0,031		
3	KCL	0,04	0,014	0,018	3,75724907
	CH3	0,043	0,035		
4	KCL	0,062	0,021	0,017	3,54851301
	CH3	0,052	0,028		
5	KCL	0,039	0,009	0,018	3,75724907
	CH3	0,043	0,031		

Fosfato de Ca 0,025M		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,072	0,023	0,017	3,54851301
	CH3	0,07	0,038		
2	KCL	0,039	0,012	0,021	4,38345725
	CH3	0,04	0,034		
3	KCL	0,046	0,018	0,02	4,17472119
	CH3	0,044	0,036		
4	KCL	0,065	0,019	0,019	3,96598513
	CH3	0,054	0,027		
5	KCL	0,086	0,036	0,014	2,92230483
	CH3	0,069	0,033		

BLANCO		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,107	0,043	0,024	5,00966543
	CH3	0,09	0,05		
2	KCL	0,1	0,034	0,022	4,59219331
	CH3	0,089	0,045		
3	KCL	0,099	0,067	0,019	3,96598513
	CH3	0,067	0,054		
4	KCL	0,082	0,029	0,014	2,92230483
	CH3	0,085	0,046		
5	KCL	0,056	0,013	0,014	2,92230483
	CH3	0,054	0,025		

**TABLA 32 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CON 0,05M O 0,025M DE FOSFATO DE CALCIO DESPUÉS DE SER PASTEURIZADOS.**

Fosfato de Ca 0,05M		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,021	0,001	0,019	3,96598513
	CH3	0,002	0,001		
2	KCL	0,013	0	0,01	2,08736059
	CH3	0,005	0,002		
3	KCL	0,014	0	0,009	1,87862454
	CH3	0,005	0		
4	KCL	0,015	0	0,011	2,29609665
	CH3	0,004	0		
5	KCL	0,018	0,002	0,012	2,50483271
	CH3	0,005	0,001		

Fosfato de Ca 0,025M		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,022	0,001	0,016	3,33977695
	CH3	0,005	0		
2	KCL	0,019	0,001	0,015	3,13104089
	CH3	0,003	0		
3	KCL	0,017	0	0,014	2,92230483
	CH3	0,004	0,001		
4	KCL	0,012	0	0,012	2,50483271
	CH3	0,003	0,003		
5	KCL	0,016	0	0,013	2,71356877
	CH3	0,004	0,001		

BLANCO		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,09	0,036	0,02	4,17472119
	CH3	0,078	0,044		
2	KCL	0,089	0,032	0,017	3,54851301
	CH3	0,07	0,03		
3	KCL	0,085	0,035	0,015	3,13104089
	CH3	0,075	0,04		
4	KCL	0,069	0,025	0,009	1,87862454
	CH3	0,082	0,047		
5	KCL	0,058	0,021	0,01	2,08736059
	CH3	0,085	0,058		

**TABLA 33 CANTIDAD DE ANTOCIANINAS QUE SE PERDIERON DE LOS EXTRACTOS DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN UTILIZANDO LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE IONES DE HIERRO Y DE CALCIO.**

Tratamiento	Repeticiones					SUM	PROM
	I	II	III	IV	V		
0,05M FE	1,84994725	1,60852746	1,79264296	1,47305413	2,0120917	8,7362635	1,7472527
0,05M CA	1,47305413	1,47305413	1,54227901	1,32378864	1,32378864	7,13596455	1,42719291
0,025M FE	1,06122956	1,15539787	0,95784765	1,06122956	1,24244931	5,47815395	1,09563079
0,025M CA	0,84186463	1,32378864	1,32378864	1,40041152	0,84186463	5,73171806	1,14634361
Blanco	1,05662276	1,19892359	1,10831371	1,19892359	1,27790469	5,84068835	1,16813767

**TABLA 34 VALORES DE PH PARA CADA MUESTRA UTILIZANDO DIFERENTES IONES METÁLICOS**

Sulfato ferroso 0,05M		Promedio		Fostato de Ca 0,05M		Promedio	
4	4,4	3,6	4	4,8	4,8	4,8	4,8
4,09	4,09	4,09	4,09	4,86	4,87	4,88	4,87
4	4,2	3,8	4	4,87	4,87	4,87	4,87
3,9	3,8	4	3,9	4,9	4,8	5	4,9
3,9	3,9	3,9	3,9	4,7	4,75	4,74	4,73
Sulfato ferroso 0,025M		Promedio		Fostato de Ca 0,025M		Promedio	
4,18	4,2	4,13	4,17	5,1	5,11	5,03	5,08
4,16	4,2	4,12	4,16	5,1	5,09	5,08	5,09
4,1	4,17	4,03	4,1	5,15	5,2	5,16	5,17
4,2	4,22	4,15	4,19	5	5,04	5,08	5,04
4,18	4,17	4,16	4,17	5	5	5,6	5,2
BLANCO		Promedio					
6,51	6,48	6,55	6,52	6,515			
6,59	6,55	6,54	6,5	6,545			
6,7	6,48	6,6	6,5	6,57			
6,49	6,49	6,49	6,49	6,49			
6,52	6,53	6,55	6,5	6,525			

## ANEXO 7. RESULTADOS ANÁLISIS UTILIZANDO DIFERENTES AMINOÁCIDOS

**TABLA 35 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CON 0,4% DE METIONINA O TREONINA.**

METIONINA 0,4%		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,128	0,062	0,021	4,38345725
	CH3	0,1	0,055		
2	KCL	0,121	0,054	0,021	4,38345725
	CH3	0,096	0,05		
3	KCL	0,13	0,058	0,028	5,84460967
	CH3	0,1	0,056		
4	KCL	0,12	0,05	0,025	5,21840149
	CH3	0,09	0,045		
5	KCL	0,091	0,034	0,019	3,96598513
	CH3	0,08	0,042		
6	KCL	0,1	0,05	0,023	4,80092937
	CH3	0,065	0,038		

TREONINA 0,4%		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,128	0,061	0,022	4,59219331
	CH3	0,1	0,055		
2	KCL	0,144	0,069	0,026	5,42713755
	CH3	0,112	0,063		
3	KCL	0,112	0,046	0,022	4,59219331
	CH3	0,088	0,044		
4	KCL	0,126	0,067	0,021	4,38345725
	CH3	0,093	0,055		
5	KCL	0,113	0,05	0,024	5,00966543
	CH3	0,091	0,052		
6	KCL	0,112	0,064	0,028	5,84460967
	CH3	0,07	0,05		

**TABLA 36 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS CON 0,4% DE METIONINA O TREONINA DESPUÉS DE SER PASTEURIZADOS.**

METIONINA 0,4%		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,111	0,05	0,025	5,21840149
	CH3	0,087	0,051		
2	KCL	0,116	0,055	0,025	5,21840149
	CH3	0,09	0,054		
3	KCL	0,119	0,049	0,032	6,6795539
	CH3	0,093	0,055		
4	KCL	0,152	0,075	0,027	5,63587361
	CH3	0,12	0,07		
5	KCL	0,086	0,031	0,022	4,59219331
	CH3	0,073	0,04		
6	KCL	0,118	0,065	0,028	5,84460967
	CH3	0,08	0,055		

TREONINA 0,4%		510	700	A	Antocianinas
1	KCL	0,107	0,047	0,027	5,63587361
	CH3	0,082	0,049		
2	KCL	0,115	0,041	0,03	6,26208178
	CH3	0,1	0,056		
3	KCL	0,096	0,037	0,024	5,00966543
	CH3	0,08	0,045		
4	KCL	0,119	0,057	0,023	4,80092937
	CH3	0,091	0,052		
5	KCL	0,108	0,044	0,027	5,63587361
	CH3	0,086	0,049		
6	KCL	0,105	0,054	0,031	6,47081784
	CH3	0,065	0,045		

**TABLA 37 CANTIDAD DE ANTOCIANINAS QUE SE PERDIERON DE LOS EXTRACTOS DESPUÉS DE LA PASTEURIZACIÓN UTILIZANDO METIONINA Y TREONINA**

Tratamiento	Repeticiones						SUM	PROM
	I	II	III	IV	V	VI		
Metionina	1,15539787	1,15539787	1,15539787	0,95784765	1,06122956	1,24244931	6,72772013	1,121286689
Treonina	1,24244931	1,15539787	0,95784765	0,95784765	1,06122956	1,06122956	6,4360016	1,072666934

**TABLA 38 VALORES OBTENIDOS DE ANTOCIANINAS CON EL USO DE METIONINA**

Metionina 0,4%	ACN Antes T (mg/L)	ACN Después T (mg/L)	% Incremento
1	4,383457	5,2184015	19,047626
2	4,383457	5,2184015	19,047626
3	5,84461	6,6795539	14,285708
4	5,218401	5,6358736	8,00001
5	3,965985	4,5921933	15,789477
			<b>P 15,234089</b>

**TABLA 39 VALORES OBTENIDOS DE ANTOCIANINAS CON EL USO DE TREONINA**

Treonina 0,4%	ACN Antes T (mg/L)	ACN Después T (mg/L)	% Incremento
1	4,592193	5,6358736	22,72728084
2	5,427138	6,2620818	15,38460603
3	4,592193	5,0096654	9,090915822
4	4,383457	4,8009294	9,523816476
5	5,009665	5,6358736	12,50000948
			<b>P 13,845326</b>

<b>TABLA 40 VALORES DE PH PARA CADA MUESTRA UTILIZANDO DIFERENTES AMINO ÁCIDOS</b>			
Metionina 4%			Promedio
6,45	6,46	6,38	6,43
6,3	6,3	6,36	6,32
6,6	6,6	6,42	6,54
6	5,5	5,9	5,8
5,9	5,7	4,6	5,4
6,65	6,5	6,68	6,61
Treonina 4%			Promedio
6,38	6,37	6,36	6,37
6,36	6,36	6,36	6,36
6,38	6,43	6,39	6,4
6,35	6,4	6,45	6,4
6,37	6,39	6,5	6,42
6,42	6,38	6,34	6,38
BLANCO			Promedio
6,65	6,57	6,61	6,61
6,49	6,58	6,7	6,59
6,6	6,67	6,59	6,62
6,5	6,3	6,67	6,49
6,5	6,5	6,5	6,5
6,5	6,5	6,5	6,5

**ANEXO 8. FOTOGRAFÍAS****FOTOGRAFÍA 1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE ANTOCIANINAS**

**FOTOGRAFÍA 2 CUANTIFICACIÓN ANTOCIANINAS DE LAS TRES VARIETADES DE MAÍZ MORADO**

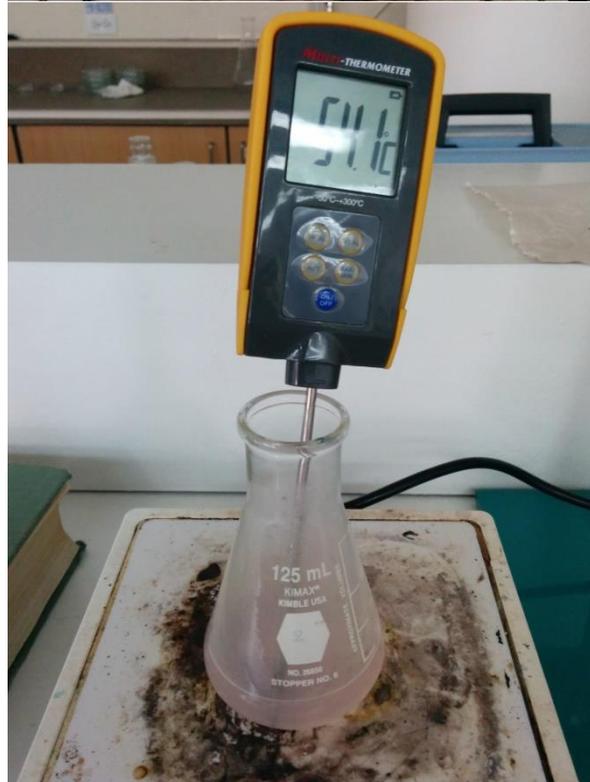


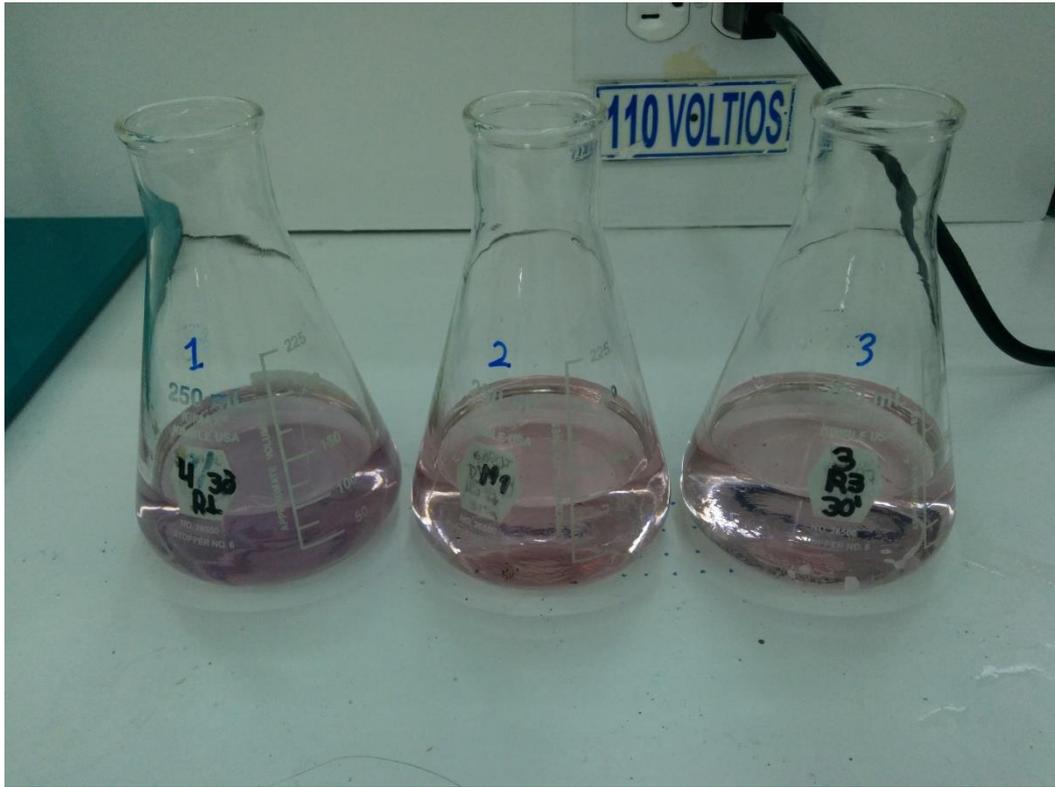
**FOTOGRAFÍA 3 EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PH 2**



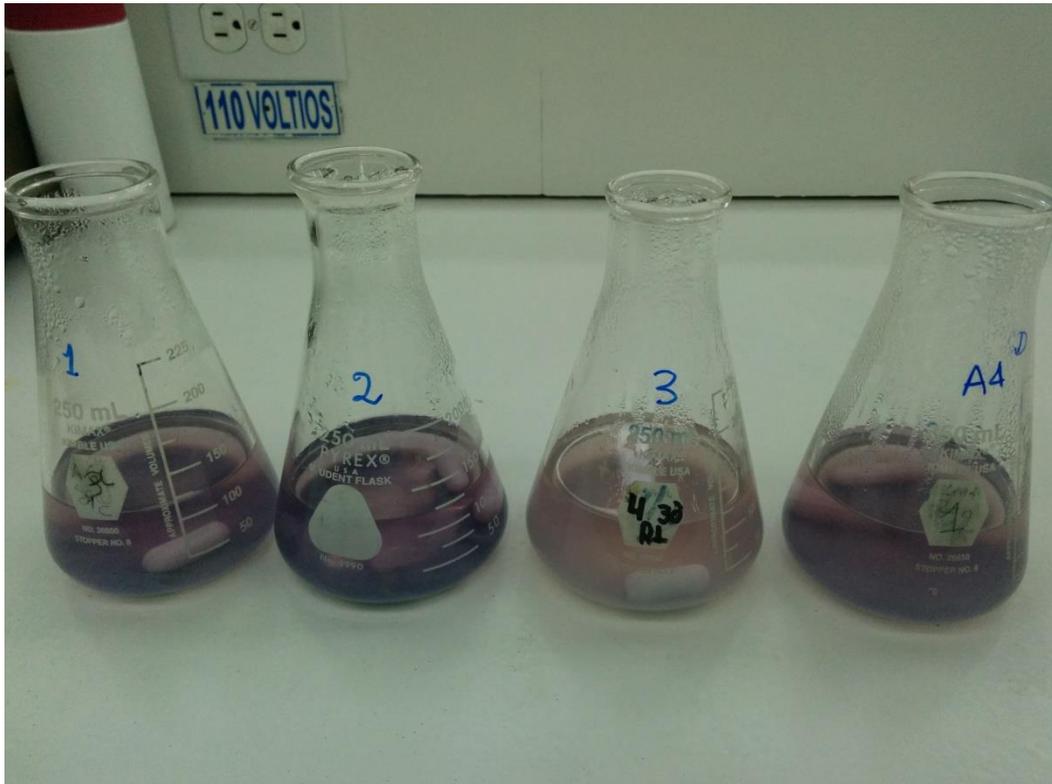
**FOTOGRAFÍA 4 PASTEURIZACIÓN DEL EXTRACTO DE ANTOCIANINAS A PH 2****FOTOGRAFÍA 5 DESTILACIÓN DE ETANOL DEL EXTRACTO DE ANTOCIANINAS.**

**FOTOGRAFÍA 6 PASTEURIZACION DE LOS EXTRACTOS DE ANTOCIANINAS**

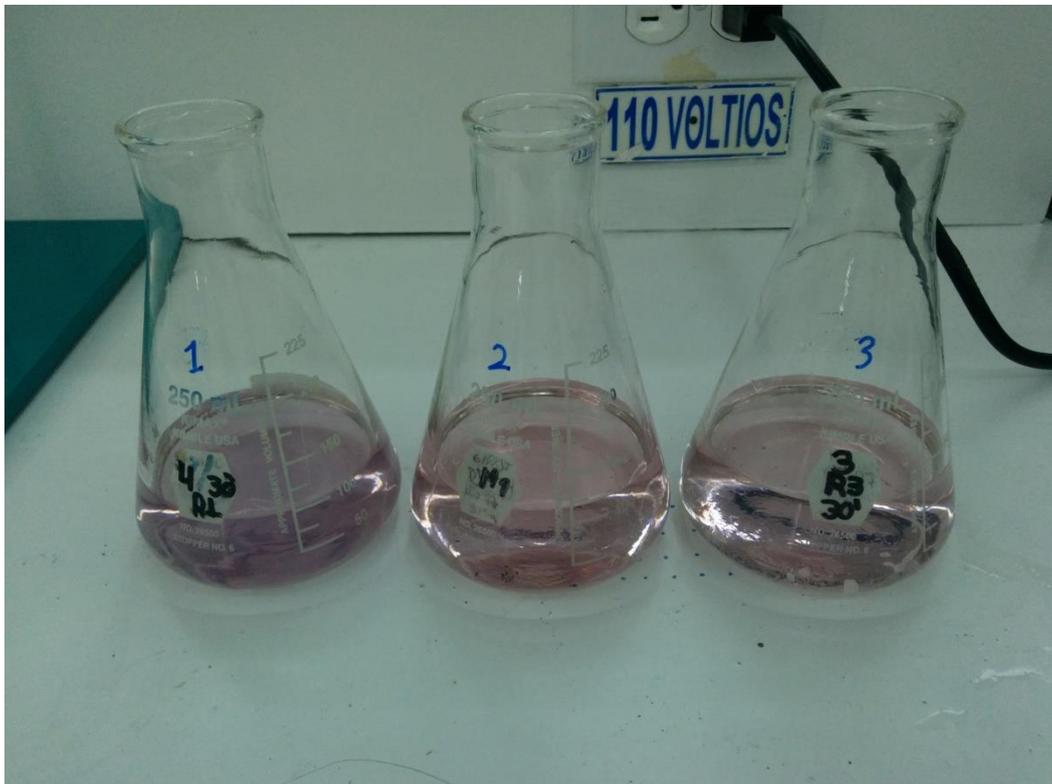


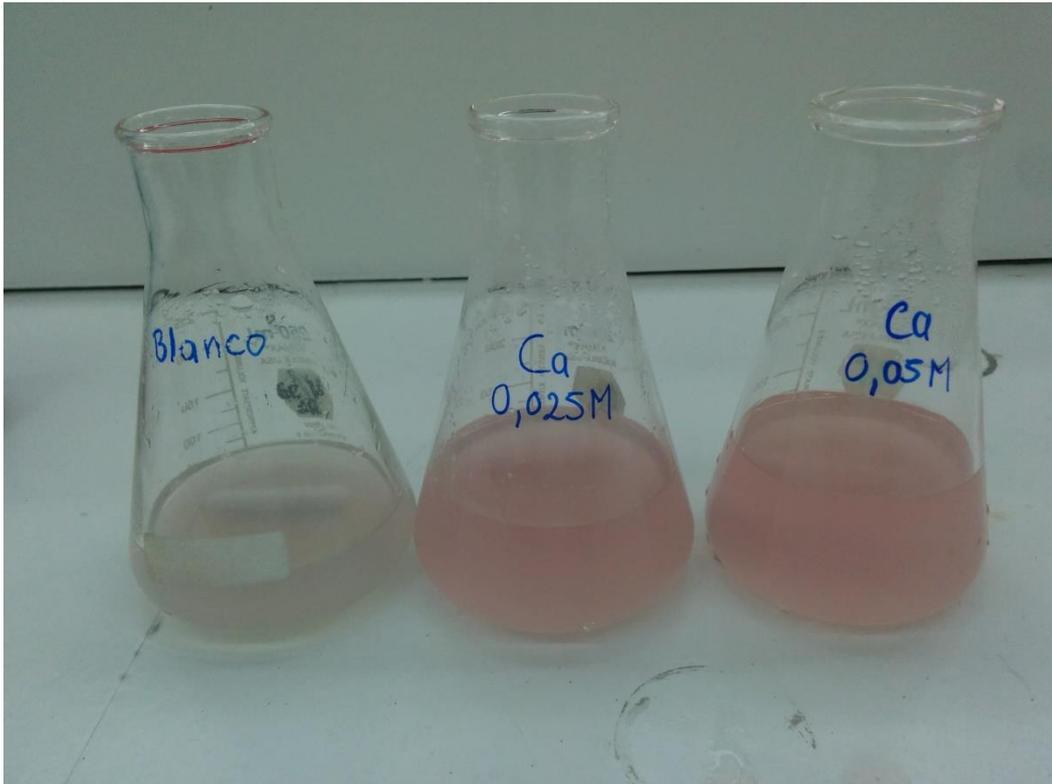
**FOTOGRAFÍA 7 EXTRACTOS DESPUES DE LA PASTEURIZACION RAPIDA (STHT)****FOTOGRAFÍA 8 EFECTOS DE LA ADICIÓN DE DIVERSAS MOLÉCULAS EN LOS EXTRACTOS DE ANTOCIANINAS.**

**FOTOGRAFÍA 9** DIVERSAS CONCENTRACIONES DE IONES EN LOS EXTRACTOS DE ANTOCIANINAS.



**FOTOGRAFÍA 10** DIVERSAS CONCENTRACIONES DE IONES EN LOS EXTRACTOS DE ANTOCIANINAS.

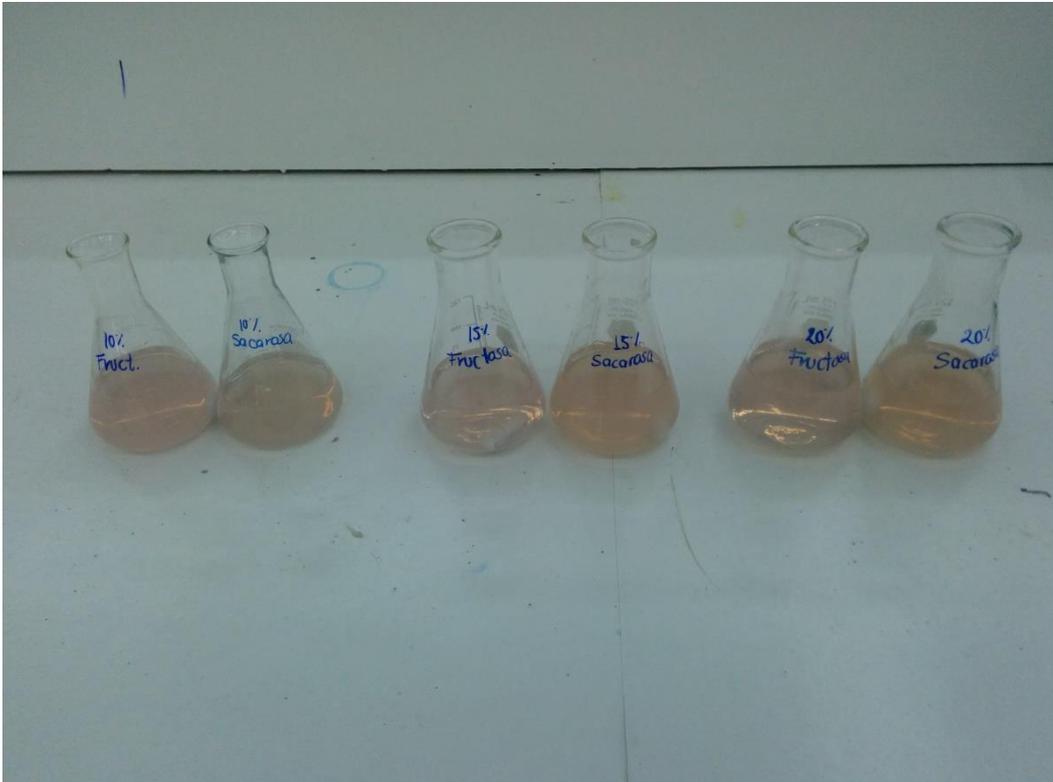


**FOTOGRAFÍA 11 ADICIÓN DEL CALCIO EN CONCENTRACIONES DE 0,025 Y 0,05M****FOTOGRAFÍA 12 ADICIÓN DEL HIERRO EN CONCENTRACIONES DE 0,025 Y 0,05M**

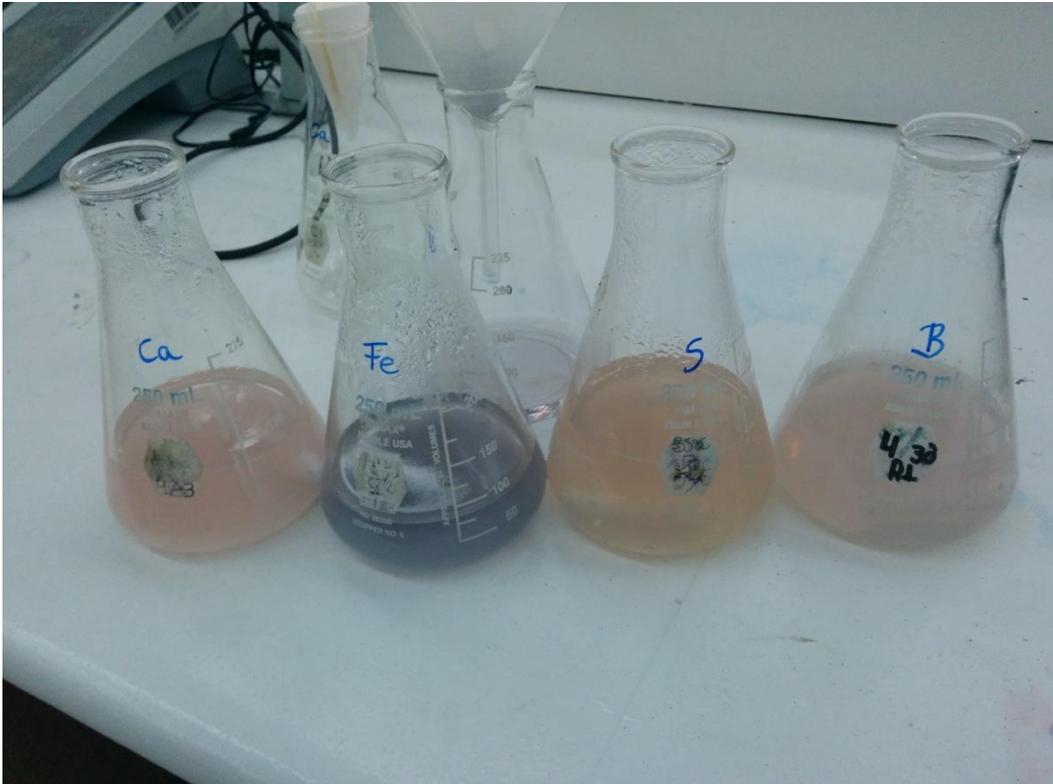
**FOTOGRAFÍA 13 DIFERENCIA DE COLOR DE LOS EXTRACTOS CON HIERRO, CALCIO Y EL BLANCO**



**FOTOGRAFÍA 14 DIVERSAS CONCENTRACIONES DE AZÚCARES EN LOS EXTRACTOS.**



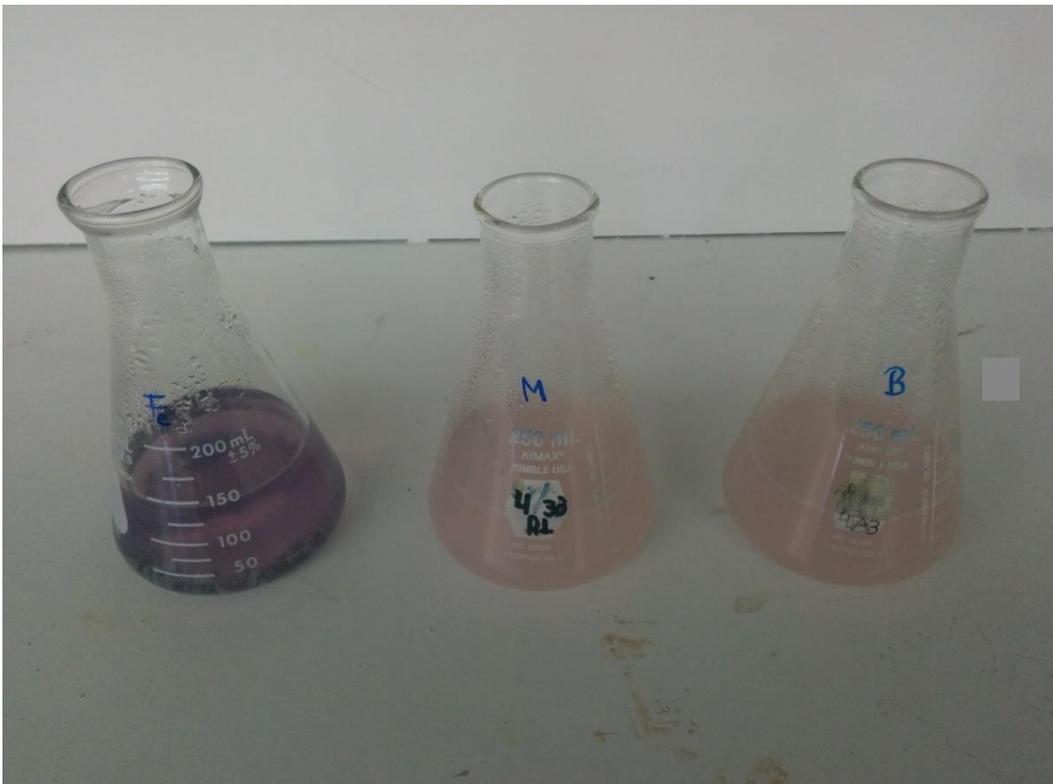
**FOTOGRAFÍA 15 10% DE AZÚCARES EN LOS EXTRACTOS DE ANTOCIANINAS****FOTOGRAFÍA 16 15% DE AZÚCARES EN LOS EXTRACTOS DE ANTOCIANINAS**

**FOTOGRAFÍA 17 20% DE AZÚCARES EN LOS EXTRACTOS DE ANTOCIANINAS****FOTOGRAFÍA 18 CONCENTRACIONES MÁS ALTAS DE LAS MOLÉCULAS Y BLANCO**

**FOTOGRAFÍA 19 TRATAMIENTO DE HIERRO EL MÁS PERJUDICIAL EN LA ESTABILIDAD DE ANTOCIANINAS Y EL DE METIONINA EL MEJOR PARA LA ESTABILIDAD DE LOS PIGMENTOS FRENTE A LA PASTEURIZACIÓN.**



**FOTOGRAFÍA 20 AMINOACIDOS METIONINA Y TREONINA COMPARADOS CON HIERRO 0,05M**



## ANEXO 9. FICHAS TÉCNICAS

## FIGURA 9. FICHA TÉCNICA FOSFATO DE CALCIO

# Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

<b>Product Name</b>	Calcium phosphate monobasic, ≥95%
<b>Product Number</b>	C8017
<b>Product Brand</b>	ALDRICH
<b>Molecular Formula</b>	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>
<b>Molecular Weight</b>	234.05

<b>TEST</b>	<b>LOT 121K0044 RESULTS</b>
<b>APPEARANCE</b>	CONFORMS
<b>SOLUBILITY</b>	CONFORMS
<b>LOSS ON DRYING</b>	5.6%
<b>PURITY BY EDTA TITRATION *</b>	102%
<b>QC RELEASE DATE</b>	DECEMBER 2001



Rodney Burbach, Manager  
Quality Control  
St. Louis, Missouri USA

## FIGURA 10. FICHA TÉCNICA SULFATO FERROSO



ISO 9001-2008 REGISTERED

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Product Name : - FERROUS SULPHATE AR/ACS (HEPTAHYDRATE) Analyzed on: - 17/03/13  
 Mol. Formula : -  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
 Mol. Weight : - 278.01  
 Article no. : - 03850  
 CAS No. : - 7782-63-0  
 Lot no. : - SG60481303  
 Mfg date : - MAR-2013  
 Exp date : - FEB-2016

Sr. no.	Tests	Specifications	Results
1	Description	Green coloured crystalline powder	Green coloured crystalline powder
2	Assay	Min 99.0%	100.5%
3	Insoluble matter	Max 0.01%	0.003%
4	pH (5% water)	Max 3.0 - 4.0	3.5
5	Chloride (Cl)	Max 0.001%	0.0003%
6	Phosphate ( $\text{PO}_4$ )	Max 0.001%	0.0003%
7	Copper (Cu)	Max 0.005%	0.0003%
8	Ferric iron (Fe)	Max 0.1%	0.02%
9	Manganese (Mn)	Max 0.05%	0.043%
10	Zinc (Zn)	Max 0.005%	0.0047%
11	Calcium (Ca)	Max 0.005%	0.00035%
12	Magnesium (Mg)	Max 0.002%	0.00031%
13	Potassium (K)	Max 0.002%	0.0019%
14	Sodium (Na)	Max 0.02%	0.0141%

*This above product complies as per the specifications of LOBA CHEMIE*

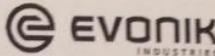
FIGURA 11. FICHA TÉCNICA METIONINA

Evonik Industries AG - Werk Degussa - D-63403 Hanau, Germany

Evonik Industries AG  
Production Plant Wesseling, HN-Labor  
Health & Nutrition  
Brühler Straße 2  
D-50389 Wesseling

Sold-to  
Pollo Favorito SA Pofasa  
RUC: 1790252361001  
Av. Eloy Alfaro s/n y Avigiras  
170150 QUITO  
ECUADOR

Ship-to  
POFASA S.A.  
Calle Avigiras E12-70  
y Av. Eloy Alfaro  
QUITO  
ECUADOR



Page 1 of 1

**Declaration of Compliance with the order according to EN 10204 - 2.1**

Date	28.10.2014	
PO Number	Item	Date
EC-610/2014		11.07.2014
Delivery Number	Item	Date
3000667180	000002	17.11.2014
Order Number	Item	Date
2000392829	000002	14.07.2014

Customer Number  
7000060977

Product **MetAMINO ©**  
**DL-Methionine Feed Grade 99%**  
25 KG Paper Bag

Material 99029515

Batch 140918W2X

Quantity **4.500** KG

Vessel: Cap Trafalgar

Manufacturing Date: 18.09.2014

Expiration date 18.09.2019

Spec.No. 4648/2

Valid From 20121206

Spec. title DL-Methionin FG

Property	Unit	Value	Target	min.	max.
679_AS01 Assay	%			99,00	
679_MT01 Method MT01					
679_LD01 Loss on drying	%				0,30
679_XLD1 Method XLD1					
679_XA01 Ash	%				0,50
679_XA01 Method XA01					

sign. C. Paul-Keldenich / Quality Control Manager / HN-MT-WES

This certificate is valid without signature.

This information and all technical and other advice are based on Evonik's present knowledge and experience. However, Evonik assumes no liability for such information or advice, including the extent to which such information or advice may relate to third party intellectual property rights. Evonik reserves the right to make any changes to information or advice at any time, without prior or subsequent notice. EVONIK DISCLAIMS ALL REPRESENTATIONS AND WARRANTIES, WHETHER EXPRESS OR IMPLIED, AND SHALL HAVE NO LIABILITY FOR MERCHANTABILITY OF THE PRODUCT OR ITS FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE (EVEN IF EVONIK IS AWARE OF SUCH PURPOSE), OR OTHERWISE. EVONIK SHALL NOT BE RESPONSIBLE FOR CONSEQUENTIAL, INDIRECT OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING LOSS OF PROFITS) OF ANY KIND. It is the customer's sole responsibility to arrange for inspection and testing of all products by qualified experts. Reference to trade names used by other companies is neither a recommendation nor an endorsement of the corresponding product, and does not imply that similar products could not be used.

\*\*\* End \*\*\*

FIGURA 12. FICHA TÉCNICA TREONINA



**Inspection Certificate / Certificate of Analysis** October 28, 2014

according to EN 10 204-2.1

**Produkt: ThreAMINO®** Evonik Agroferm Zrt.

L-Threonine, Feed Grade 98.5% Analytical laboratory  
Phone +36 54 520 100

Control-/Lot-No.: 140926K1A Nádudvari útfel  
Kübe 4100  
Hungary  
www.evonik.com

Spec no: 1005/1

This is to certify that the consignment in question meets with the following quality specifications.

**Product Specification:**

Test Methods / Properties	Target Values	Analytical Data
TT0 Assay (perchloric acid titration)	min. 98.5 %	99,70%
XLD Loss on drying (heat incubator)	max. 0.5 %	0,24%
XAC Ash	max. 0.5 %	0,06%

Manufacturing date: *Döbröndi*

Expiry date: *Döbröndi*

Analytical laboratory: Éva Döbröndi

**Evonik Agroferm**  
**Fermentációsipari Zrt.**  
**4183 Kübe, Nádudvari útfel**  
**9.**

September 26, 2014

September 25, 2019

This information and all technical and other advice are based on Evonik's present knowledge and experience. However, Evonik assumes no liability for such information or advice, including the extent to which such information or advice may relate to third party intellectual property rights. Evonik reserves the right to make any changes to information or advice at any time, without prior or subsequent notice. EVONIK DISCLAIMS ALL REPRESENTATIONS AND WARRANTIES, WHETHER EXPRESS OR IMPLIED, AND SHALL HAVE NO LIABILITY FOR MERCHANTABILITY OF THE PRODUCT OR ITS FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE (EVEN IF EVONIK IS AWARE OF SUCH PURPOSE), OR OTHERWISE. EVONIK SHALL NOT BE RESPONSIBLE FOR CONSEQUENTIAL, INDIRECT OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING LOSS OF PROFITS) OF ANY KIND. It is the customer's sole responsibility to arrange for inspection and testing of all products by qualified experts. Reference to trade names used by other companies is neither a recommendation nor an endorsement of the corresponding product, and does not imply that similar products could not be used.