



| | |
|---|--|
| Fecha de presentación | Julio 2010 |
| Estación experimental | Santa Catalina |
| Programa/ Departamento | Nutrición y Calidad |
| Proyecto | Código: 2100527033 Título: Valorización de cultivos y materias primas para respaldar las certificaciones de origen. Desarrollar y aplicar procesos tecnológicos y agroindustriales a través de sistemas integrados de calidad, sanidad e inocuidad, a lo largo de la cadena agro productiva |
| Resultado | Numero:1 Título: Caracterización de la calidad física, química y funcional de materias primas y productos, a lo largo de la cadena agroalimentaria |
| Actividad , Título | Numero: 1 Extracción y caracterización del colorante del Maíz negro (<i>Zea mays</i> L.), determinación de su actividad antioxidante y antifúngica |
| Ubicación | Provincia: Pichincha Cantón: Mejía Parroquia: Cutuglagua |
| Autor Co-autores | Egda. Fernanda Almeida Ing. Elena Villacrés |
| Colaboradores | Programa de Maíz |
| Fecha de iniciación / Fecha de terminación | Julio 2010 Julio 2011 |
| Presupuesto | 5.148,15 |
| Fuente de financiamiento | Fondos fiscales 48 %: 2.162,28 Tesista 52 %: 2.985,93 |

1. ANTECEDENTES

En la sierra del Ecuador, el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) es uno de los más importantes, debido principalmente a la amplia área dedicada a su producción y por ser un componente básico en la dieta de la población, lo que determina que este grano sea considerado como un rubro prioritario para la investigación que realiza el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Ecuador es uno de los países con mayor diversidad genética de maíz por unidad de superficie, el preservarla representa el recurso natural renovable más importante para la supervivencia, sostenibilidad rural y seguridad alimentaria de las futuras generaciones, (Yáñez *et al.*, 2003).

Actualmente se reconocen 29 razas de maíz, de las cuales 17 pertenecen a la sierra, siendo esta región considerada fuente de las mayores riquezas genéticas por unidad de superficie. Los especímenes típicos de la raza de maíz negro (racimo de uva) se encuentran a 2580 msnm, en forma de granos redondos con pericarpio rojo o negro, estrechamente agrupados para dar la apariencia de un racimo de uvas. Las mazorcas son de tamaño medio, de forma cónicas a ovales con ocho a catorce hileras en espiral. El color varía de rojizo a púrpura en toda la tusa, incluidas las lemas, las glumas y la medula, (Yáñez *et al.*, 2003).

El maíz negro es una variedad que posee la coronta y los granos de color rojo morado (Ramírez, 2005). Tiene un ingrediente natural denominado *cianidina-3- b-glucosa*, el cual pertenece a las denominadas antocianinas, pigmentos que dan color a las frutas y vegetales, ayudan a combatir el estrés oxidativo, las enfermedades degenerativas y a la vez brindan efectos benéficos para la salud y el bienestar. Debido a estas propiedades el maíz negro podría inscribirse en la categoría de alimento funcional, ya que sus componentes alimentarios proveen beneficios a la salud más allá de la nutrición básica, (Manrique, 2000).

El color es la primera sensación que se percibe de un alimento y la que determina el primer juicio sobre su calidad, ya que tiende a veces a modificar subjetivamente otras sensaciones como el sabor y el olor, condicionando el éxito o fracaso de un producto en el mercado. Los alimentos naturales como el maíz negro tienen su propio color y lo ideal sería que se mantuviera a lo largo del proceso de transformación en la industria, pero la mayoría de las veces no es así, conduciendo al procesador de alimentos a utilizar colorantes como aditivo, (Cubero *et al.*, 2002).

Actualmente el uso de colorantes sintéticos en alimentos ha sido severamente cuestionado en los países desarrollados, ya que algunos reportes indican que el consumo indiscriminado de estos pigmentos está ligado con el desarrollo de enfermedades degenerativas como algunos tipos de cáncer, (Salinas *et al.*, 2010).

Las antocianinas son el grupo más importante de compuestos naturales, hidrosolubles, responsables de los colores rojos, púrpura y azul que se aprecian en flores, frutos y otras partes de las plantas. La mayor fuente de obtención industrial es la piel de la uva negra y de otras industrias de zumos. Por años estos compuestos han sido consumidos por el hombre sin ningún efecto perjudicial evidente. (Salinas *et al.*, 2010).

Los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante. Estudios con fracciones de antocianinas provenientes del vino han demostrado que estas son efectivas en atrapar especies reactivas del oxígeno, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas, (Garzón, 2008).

De igual manera, varios frutos ricos en antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y contra los radicales peróxido, (-ROO.), superóxido ($-O_2^-$), hidroxilo (-OH) y el oxígeno (O_2), (Garzón, 2008).

Las antocianinas son el miembro más reconocido del grupo de los flavonoides, especialmente la epicatequina inhibe la transcriptasa reversa derivada del virus de la leucemia. Sin embargo las propiedades antimicrobianas de la mayoría de compuestos fenólicos como las antocianinas y taninos, son mucho menores que las de productos como las antibióticos, (Marquez *et al.*, 2007, Arroyo *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo tiene por objeto la extracción y caracterización del colorante, a partir de los granos y la coronta del maíz negro, orientado a utilizarlo como aditivo alimentario natural en la producción de diversos alimentos como cereales de desayuno, productos de panadería y confitería.

En el maíz negro existen muchos factores que influyen en la composición y concentración de compuestos con actividad biológica. En este estudio se abordará el efecto de las condiciones de procesamiento y almacenamiento sobre los componentes del color (coordenadas colorimétricas, brillo y luminosidad), los que guardan estrecha relación con la concentración de compuestos bioactivos (antocianinas y taninos). Se analizará la composición química del extracto colorante, con énfasis en los nitratos y oxalatos, con el fin de asegurar su inocuidad para el consumo; llegando a una comprensión de sus posibles efectos beneficiosos para la salud, a través de su actividad antioxidante, uno de los modos de acción más importantes para la prevención de las principales enfermedades degenerativas relacionadas con la edad.

A pesar del gran valor nutritivo y cultural que representa el maíz negro, su presencia comercial en los mercados es limitada y su frecuencia de consumo ha disminuido considerablemente en la población, siendo necesario identificar alternativas de valorización que contribuyan a incrementar el área cultivada, el uso y el consumo de esta especie, así como también aliviar la situación de pobreza de los pequeños agricultores que aún siembran este grano, sólo para el autoconsumo, sin una opción que les permita articular su producción al mercado.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Extraer y caracterizar el colorante natural del Maíz Negro (*Zea mays* L.) orientado a utilizarlo como aditivo alimentario.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las condiciones óptimas para la extracción del colorante a partir de los granos y la coronta del maíz negro (*Zea mays* L.)
- Realizar la caracterización química del extracto colorante sólido
- Evaluar la estabilidad del colorante obtenido a diferentes condiciones de proceso y almacenamiento
- Determinar la actividad antioxidante del extracto colorante sólido
- Determinar la actividad antifúngica del extracto colorante
- Determinar el costo de producción del colorante

3.3 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Nula: El colorante de los granos y el de la coronta del maíz no negro es fácilmente extractable, estable a diversas condiciones de proceso y con elevada actividad antifúngica y antioxidante

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

- Maíz negro proporcionada por el Programa de maíz, EESC.
- Plancha sumergible de agitación magnética

4.2 Reactivos

- Acido Sulfúrico (grado técnico)
- Acido Clorhídrico
- Hidróxido de sodio
- Acido bórico al 4%
- Indicador mixto: rojo de metilo al 0.1% y verde de bromocresol al 0,2% en alcohol de 95%
- Zinc en gránulos
- Sulfato de sodio anhidro
- Acido nítrico: HNO₃
- Solución de permanganato de potasio
- Solución amortiguadora de acetato
- Acido fosfowolfrámico
- Solución de lantano
- Antiespumante: alcohol isoamílico
- Acido ascórbico

- Solución de cobre

4.3 Equipo y materiales de laboratorio

- Balanza Analítica
- Espectrofotómetro UV-vis
- Colorímetro
- Balones aforados 100mL
- Aparato de digestión y destilación micro Kjeldahl
- Balones Kjeldahl de 50 mL
- Titulador automático
- Estufa
- Equipo de Goldfish

5. METODOLOGIA

Características del Sitio Experimental

- Laboratorio de Nutrición y Calidad, INIAP, Estación Santa Catalina

Ubicación

| | |
|------------|---|
| Provincia: | Pichincha. |
| Cantón: | Mejía. |
| Parroquia: | Cutuglagua. |
| Lugar: | Km 1, Panamericana Sur, vía Quito-Aloag |

Situación Geográfica

| | |
|-------------------------------------|----------|
| Altitud: | 3058 m |
| Latitud: | 00°22'S. |
| Longitud: | 78°23'O |
| Temperatura promedio en Campo: | 12.6° C |
| Temperatura promedio en Laboratorio | 16°C |

Fuente: Cabezas, (2002).

5.1 Determinación de las condiciones óptimas de proceso para la extracción del colorante a partir de los granos y coronta del maíz negro

Los factores más importantes que afectan el proceso de extracción son: Tamaño de la partícula, cantidad, tipo de solvente, temperatura y tiempo de extracción (Garzón, 2008).

Manteniendo una relación solvente/grano igual a 4/1 y solvente/coronta igual a 8/1, se ensayarán los siguientes factores:

Cuadro 1. Factores en estudio para determinar las condiciones de proceso para la extracción del colorante

| Factor | Descripción del Factor | Descripción del Nivel | Nivel |
|--------|-------------------------|--|----------------|
| A | Sistema de solventes | Agua destilada | a ₀ |
| | | Etanol (90%) | a ₁ |
| | | Solución acuosa de ácido cítrico 0.08M | a ₂ |
| B | Tiempo de contacto (hr) | 2 | b ₀ |
| | | 1 | b ₁ |
| C | Temperatura (°C) | 30 | c ₀ |
| | | 40 | c ₁ |
| | | 50 | c ₂ |

De la combinación de los factores en estudio a diferentes niveles, se obtienen los siguientes tratamientos:

Cuadro 2. Tratamientos para la determinación de las condiciones apropiadas de proceso para la extracción del colorante

| TRATAMIENTOS | | | |
|--------------|--------|---|--|
| | a0b0c0 | Agua destilada; 1 hora; 30°C | |
| T2 | a0b0c1 | Agua destilada; 1 hora; 40°C | |
| T3 | a0b0c2 | Agua destilada; 1 hora; 50°C | |
| T4 | a0b1c0 | Agua destilada; 2 horas; 30°C | |
| T5 | a0b1c1 | Agua destilada; 2 horas; 40°C | |
| T6 | a0b1c2 | Agua destilada; 2 horas; 50°C | |
| T7 | a1b0c0 | Etanol (90%); 1 hora; 30°C | |
| T8 | a1b0c1 | Etanol (90%); 1 hora; 40°C | |
| T9 | a1b0c2 | Etanol (90%); 1 hora; 50°C | |
| T10 | a1b1c0 | Etanol (90%); 2 horas; 30°C | |
| T11 | a1b1c1 | Etanol (90%); 2 horas; 40°C | |
| T12 | a1b1c2 | Etanol (90%); 2 horas; 50°C | |
| T13 | a2b0c0 | Solución acuosa de ácido cítrico 0.08M; 1 hora; 30°C | |
| T14 | a2b0c1 | Solución acuosa de ácido cítrico 0.08M; 1 hora; 40°C | |
| T15 | a2b0c2 | Solución acuosa de ácido cítrico 0.08M; 1 hora; 50°C | |
| T16 | a2b1c0 | Solución acuosa de ácido cítrico 0.08M; 2 horas; 30°C | |
| T17 | a2b1c1 | Solución acuosa de ácido cítrico 0.08M; 2 horas; 40°C | |
| T18 | a2b1c2 | Solución acuosa de ácido cítrico 0.08M; 2 horas; 50°C | |

Unidad experimental: muestras de 150 g para los granos y 50 g para las corontas.

Tipo de diseño: Se aplicará un diseño de bloques completos al azar en arreglo factorial $a \times b \times c$ ($3 \times 2 \times 3$) con 3 repeticiones

Cuadro N 3. Esquema del análisis de varianza para la determinación de las condiciones de proceso para la extracción del colorante

| Fuente de variación | Grados de libertad | |
|------------------------|--------------------------------------|----|
| Total | $(a \times b \times c \times r - 1)$ | 53 |
| Tratamientos | $(t - 1)$ | 17 |
| Factor A (solvente) | $(a - 1)$ | 2 |
| Factor B (tiempo) | $(b - 1)$ | 1 |
| Factor C (temperatura) | $(c - 1)$ | 2 |
| Efecto A*B | $(a - 1)(b - 1)$ | 2 |
| Efecto A*C | $(a - 1)(c - 1)$ | 4 |
| Efecto B*C | $(b - 1)(c - 1)$ | 2 |
| Efecto A*B*C | $(a - 1)(b - 1)(c - 1)$ | 4 |
| Error | Diferencia | 36 |

Análisis funcional

Para los tratamientos significativos se aplicará la prueba de Tukey al 5 %.

Variables y métodos de evaluación

- Antocianinas y taninos: Los métodos específicos para su determinación se detallan en los Anexos N° 5 y 7.
- Rendimiento
- Intensidad de color, Índice de tonalidad e índice de degradación: Se detalla en el Anexo N°1
- Componentes del color: Con la ayuda de un colorímetro se determinarán las coordenadas de color a,b; tono, cromaticidad y claridad, como se describe en el Anexo N°2

Manejo específico del experimento

El grano que ha alcanzado la madurez apropiada de cosecha, será transportado al laboratorio, deshidratado hasta un contenido de humedad al 12 % y almacenado en recipientes herméticos, previo a la realización de los diferentes ensayos.

Para la extracción del colorante, el grano será separado de las corontas, reservando cada fracción. Tanto el grano como las corontas serán tratados con diferentes solventes, a tres temperaturas y dos tiempos de contacto. Después de la aplicación de cada tratamiento, se filtrará el conjunto, rescatando el filtrado, el mismo que se someterá a liofilización para luego determinar el rendimiento de extracción y los componentes del color.

5.2 Caracterización química del extracto colorante sólido

El colorante extraído a partir del grano y las corontas, aplicando las mejores condiciones de proceso identificadas en 5.1, será analizado aplicando metodologías específicas para los siguientes parámetros:

- Nitratos
- Oxalatos
- Antocianinas
- Polifenoles

La descripción detallada de los métodos consta en los Anexos 3 al 6

Se identificará las longitudes de onda de máxima absorción, lo que orientará la composición de los pigmentos característicos del colorante en estudio, según la metodología descrita en el Anexo 1.

Análisis estadístico

La diferencia de composición entre el colorante extraído de las corontas y del grano, se determinará aplicando el estadístico "t student" a un nivel de probabilidad del 5 %, para cada uno de los parámetros de estudio.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{n}}}$$

\bar{X}_1 = Media de una variable correspondiente al colorante de los granos

\bar{X}_2 = Media de una variable correspondiente al colorante de las corontas

S_1^2 = Desviación estándar de una variable correspondiente al colorante de los granos

S_2^2 = Desviación estándar de una variable correspondiente al colorante de las corontas

Para n = 4

Con: n-1 Grados de libertad

Variables y métodos de evaluación

Nitratos: método de la A.O.A.C. (Anexo 3)

Oxalatos: método de la A.O.A.C. 974.24 (Anexo 4)

Antocianinas: método espectrofotométrico (Anexo 5)

Polifenoles: método espectrofotométrico (Anexo 6)

5.3 Evaluación de la estabilidad del colorante obtenido a diferentes condiciones de almacenamiento.

a. Estabilidad a diferentes condiciones de proceso

Los factores más usuales que afectan la estabilidad del colorante son el pH y la temperatura, por lo que se realizará un análisis exploratorio a los siguientes niveles:

pH: 2, 4, 6, 8

Temperatura (°C): 10, 30, 50, 70, 90

Se determinará el índice de degradación del color, en base a medidas de absorbancia mínima y máxima a partir del espectro de absorción de colorante como se describe en el Anexo N°1.

La expresión grafica del índice de degradación del color vs. pH y temperatura, permitirá determinar los niveles de los factores, a los cuales el colorante es estable. Se determinará la relación matemática que describa el comportamiento de las 2 variables.

Posteriormente se aplicará un diseño completamente al azar en arreglo factorial axb, para identificar la interacción óptima (pH, temperatura) para mantener la estabilidad del colorante.

b. Estabilidad en el almacenamiento

El colorante extraído con la técnica seleccionada en 5.1, será sometido a ensayos de estabilidad en dos posibles formas comerciales: Líquido y Sólido.

Cuadro 4. Tratamientos para la determinación de la estabilidad del extracto colorante sólido, durante el almacenamiento

| TRATAMIENTOS | |
|--------------|---|
| T1 | Sólido, Expuesto a la luz |
| T2 | Sólido, Almacenado en la oscuridad |
| T3 | Sólido, Expuesto al O ₂ del aire |
| T4 | Sólido, Sellado al vacío |

Cuadro 5. Tratamientos para la determinación de la estabilidad del extracto colorante líquido, durante el almacenamiento

| TRATAMIENTOS | |
|--------------|--|
| T1 | Líquido, Expuesto a la luz |
| T2 | Líquido, Almacenado en la oscuridad |
| T3 | Líquido, Expuesto al O ₂ del aire |
| T4 | Líquido, con Nitrógeno inerte |

Unidad experimental: Estará constituida por muestras de 10 g para presentaciones sólidas y 100 ml para líquidas.

Tipo de diseño: Se aplicará un diseño completamente al azar tanto para la muestra sólida como líquida, con 3 observaciones por tratamiento.

Cuadro 6. Esquema del análisis de varianza para la determinación de la estabilidad en el almacenamiento del extracto colorante sólido

| Fuente de Variación | Grados de libertad | |
|---------------------|--------------------|----|
| Total | $(k*r)-1$ | 11 |
| Tratamientos | $(k-1)$ | 3 |
| Error | $k(r-1)$ | 8 |

Cuadro 7. Esquema del análisis de varianza para la determinación de la estabilidad en el almacenamiento del extracto colorante líquido

| Fuente de Variación | Grados de libertad | |
|---------------------|--------------------|----|
| Total | $(k*r)-1$ | 11 |
| Tratamientos | $(k-1)$ | 3 |
| Error | $k(r-1)$ | 8 |

Análisis funcional

Para los tratamientos significativos se aplicará la prueba de la diferencia significativa mínima al 5 %

Variables y métodos de evaluación

En base a determinación de las coordenadas del color según el método CIELAB, citado por Jiménez y Gutiérrez, 2001. (Anexo N° 2)

Se tomarán muestras cada 15 días durante 2 meses. Los resultados obtenidos orientarán la presentación comercial del producto final.

Manejo específico del experimento

Una vez obtenido al extracto colorante se procederá a evaluar la estabilidad del mismo a diferentes condiciones de proceso y durante el almacenamiento.

La estabilidad en el proceso, se determinará mediante la exposición del colorante a diferentes condiciones de pH y temperatura. La estabilidad en el almacenamiento se probará con el colorante en estado sólido y líquido, los que serán expuestos a la luz, en cámara de maduración provista de luminosidad permanente; en cámara de maduración sin luz; en un vaso de precipitación expuesto al oxígeno del aire, envasado en atmósfera de nitrógeno y sellado al vacío, en recipientes herméticos.

En el caso de los tratamientos T3, T4, T7 y T8, las muestras se destruyen después del análisis de las coordenadas del color, por lo que se prepararán 30 muestras de 2 g en el caso del extracto sólido y 30 muestras de 25 ml en el caso del extracto líquido.

5.4 Determinación de la actividad antioxidante del extracto colorante

La actividad antioxidante del colorante se evaluará por medio de la inhibición de la oxidación del ácido ascórbico en una mezcla con agua desionizada en presencia de sulfato de cobre como se describe en el Anexo 8.

Cuadro 8. Tratamientos para la determinación de la actividad antioxidante del extracto colorante

| TRATAMIENTOS | |
|--------------|--|
| T1 | Extracto colorante concentrado |
| T2 | Extracto colorante al 25 % de su concentración inicial |
| T3 | Extracto colorante al 50 % de su concentración inicial |
| T4 | Extracto colorante al 75 % de su concentración inicial |
| T5 | E-163, testigo comercial |

Unidad experimental: Estará constituida por muestras de 4 ml.

Tipo de diseño: Se aplicará un diseño completamente al azar con 3 observaciones

Cuadro 9. Esquema del análisis de varianza para la determinación de la actividad antioxidante del extracto colorante

| Fuente de Variación | Grados de libertad | |
|---------------------|--------------------|----|
| Total | (sr-1) | 14 |
| Tratamientos | (s-1) | 4 |
| Error | S(r-1) | 10 |

Variables y métodos de evaluación: Porcentaje de ácido ascórbico oxidado (reaccionado) con la solución de cobre.

Análisis funcional

Para los tratamientos significativos se aplicará la prueba de Tukey al 5 %

Manejo específico del experimento

En base a la capacidad para inhibir la oxidación del ácido ascórbico, se evaluará la actividad antioxidante del extracto colorante a diferentes concentraciones, para lo cual se diluirá el extracto en agua destilada, comparando estos resultados con el producto comercial E-163, de conocida actividad antioxidante (323 μ moles trolox/g).

5.5 Determinación de la actividad antifúngica del extracto colorante

La actividad antifúngica del extracto colorante se evaluará en base a su capacidad para inhibir el crecimiento de los hongos *Botrytis* proveniente de la fresa y *Penicillium* aislado de la mandarina. Para cada especie de hongo se probarán los siguientes tratamientos

Cuadro 10. Tratamientos para la determinación de la actividad antifúngica del extracto colorante

| TRATAMIENTOS | |
|--------------|--|
| T1 | Extracto colorante concentrado |
| T2 | Extracto colorante al 25 % de su concentración inicial |
| T3 | Colorante al 50 % de su concentración inicial |
| T4 | Testigo comercial (Tiabendazol) |

Unidad experimental: Estará constituida por muestras de 4 ml.

Tipo de diseño: Se aplicará un diseño completamente al azar con 3 observaciones

Cuadro 11. Esquema del análisis de varianza para la determinación de la actividad antifúngica del extracto colorante

| Fuente de Variación | Grados de libertad |
|---------------------|--------------------|
| Total | (sr-1) 11 |
| Tratamientos | (s-1) 3 |
| Error | (s-1)(r-1) 8 |

Variables y métodos de evaluación: radio de crecimiento de los microorganismos desde el punto de inoculación

Análisis funcional

Para los tratamientos significativos se aplicará la prueba de Tukey al 5 %

Manejo específico del experimento

El extracto colorante se incluye en la formulación del medio de cultivo a base de agar PDA, cuando éste solidifica y enfría, se inocula el microorganismo en estudio, se incuba a 30°C por 24 h y se observa el resultado. Los extractos y concentraciones efectivas inhibirán crecimiento total de *Botrytis* y *Penicillium*. Para los efectos parciales, se medirá el radio de crecimiento de las colonias, comparando estos resultados con un testigo comercial.

5.6 Determinación del costo de producción

Se cuantificará el costo de la materia prima, el proceso y del embalaje. Se aplicará el método de presupuesto parcial, basado en los elementos del Cuadro N° 12.

Cuadro 12. Elementos para la determinación de los costos de producción del extracto colorante

| | |
|---------------------------------|---|
| Tratamiento | T |
| Rendimiento = $P_i - P_f / 100$ | |
| BB = $P_c - P_f$ | |
| CqV (costos que varían) | |
| Costo de la materia prima | |
| Costo del proceso | |
| Costo de envases | |
| Jornal | |
| ΣCqV | |
| BN = $BB - CqVc/t$ | |

BB= beneficio bruto Pc= Precio comercial T = tratamiento
 P_i = Precio inicial P_f = Precio final BN = Beneficio neto

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

| ACTIVIDADES | Duración en meses | | | | | | | | | | | |
|--|-------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| Recopilación de información | X | | | | | | | | | | | |
| Ensayos previos para la extracción a partir del grano y la coronta | | X | | | | | | | | | | |
| Elaboración del anteproyecto | | X | | | | | | | | | | |
| Determinación de las condiciones óptimas de proceso para la extracción del colorante a partir de los granos y coronta del maíz negro | | | X | X | X | | | | | | | |
| Caracterización físico química del extracto colorante sólido | | | | | | X | X | X | | | | |
| Evaluación de la estabilidad del colorante obtenido a diferentes condiciones de almacenamiento. | | | | X | X | X | X | X | | | | |
| Determinación de la actividad antioxidante y antifúngic del extracto colorante | | | | | | | X | X | | | | |
| Determinación del costo de producción | | | | | | | | X | X | X | | |
| Análisis Estadístico e interpretación de resultados | | | | | | | | | X | X | | |
| Redacción de tesis | | | | | | | | | | X | X | X |

7. PRESUPUESTO

| Categoría de gastos | Cantidad | Costo Unitario \$ | Costo Total \$ |
|---|-------------------------------|-------------------|-----------------|
| A. Personal | | | |
| Tesista | | 323,80 | 2.914,20 |
| B. Recursos Variables | | | |
| B.1 Materiales (proyecto) | | | |
| Maíz Negro | 1 qq | 60,00 | 60,00 |
| Bolsas de polietileno | 250 | 0,06 | 15,00 |
| Envases de polietileno negro | 250 | 0,06 | 15,00 |
| Papel filtro cuantitativo | 8 cajas | 50,00 | 400,00 |
| B.2 Reactivos (INIAP) | | | |
| Etanol absoluto | 20 litros | 31,84 | 636,80 |
| Determinación de oxalatos | 4 kit | 60,00 | 240,00 |
| Determinación de antocianinas | 8 análisis | 7,00 | 56,00 |
| Determinación de polifenoles | 8 análisis | 7,00 | 56,00 |
| Kits para análisis de Nitratos | 4 kit | 60,00 | 240,00 |
| B.3 Materiales de oficina (proyecto) | | | |
| Cartucho de impresora | 4 | 35,00 | 140,00 |
| CD regrabable | 4 | 2,50 | 10,00 |
| Papel | 1000 hojas | 0,04 | 40,00 |
| C. Publicación | | | |
| Tesis | 8 ejemplares | 10,00 | 80,00 |
| SUBTOTAL | | | 4.903,00 |
| Imprevistos (5 %) | | | 245,15 |
| TOTAL | | | 5.148,15 |
| FINANCIAMIENTO | Fondos fiscales (42 %) | | 2.162,22 |
| | tesista (58%) | | 2.985,93 |

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Association of Official Analytical Chemist, A.O.A.C. 1998. Peer Verified Methods. Manual on policies and procedures. Arlington, U.S.A. Adaptado en los Laboratorios del Departamento de Nutrición y Calidad de la Estación Experimental Santa Catalina-INIAP.
2. ----- . 2006. Método para la determinación de oxalatos. Manual on policies and procedures. Arlington, U.S.A.
3. Arroyo. J, Raez. E, Rodríguez. M, Chumpitaz. V, Burga. J, Cruz. W, Valencia. J. 2008. Actividad antihipertensiva y antioxidante del extracto Hidroalcohólico atomizado de maíz morado (zea mays l) en ratas, Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, Vol. 25, Núm. 2. (en línea). Perú. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/363/36311608007.pdf>
4. Cabezas A, L. 2002. Fuente de conocimiento y tecnologías agropecuarias para la competitividad, INIAP. Quito-Ecuador, pág. 29. Publicación Miscelánea N°108
5. Cubero, A.; Monferrer, A.; Villalta, J. 2002. Aditivos alimentarios. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. p. 21-48
6. Garzón GA, 2008. Las antocianinas como colorante naturales y compuesto bioactivos: revisión, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. (en línea).Bogotá-Colombia. Disponible en: <http://www.scielo.org>.
7. Jiménez, A. Gutiérrez, G. 2001. En Métodos para medir propiedades físicas e industriales de alimentos. 2ed. España, Acribia. Cap. 4, p, 330-332.
8. Manrique, A. 2000. Maíz Morado Peruano. Impreso en Lima-Perú.Instituto Nacional de Investigación Agraria. p. 5-6. (Serie Folleto R.I. N°04-00).
9. Márquez, V.; Torres, C.; Mercado, P. 2007. Actividad antifúngica del extracto total en etanol de las hojas frescas de pedilanthus tithymaloides l poit (ultimorrial). Universidad tecnológica de Pereira. (en línea). Pereira-Perú. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx>
10. Ramírez, M.; Williams, D. 2005. Guía Agro-Culinaria de Cotacachi Ecuador y Alrededores. Cali, IPGRI-Américas, FERIVA, Colombia. p. 27-28.
11. Rapisarda, P; Fanella, F; Macccarone, E. 2000. Reability of Analytical Methods for Determining Anthocyanins in Blood orange Juices. Journal of Agricultural Food Chemistry. pp. 2.249 – 2.251.
12. Salinas Y, Rubio D y Díaz A. 2010. Extracción y uso de pigmentos del grano de maíz (Zea Mays L.) como colorantes en yogur (en línea), Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. Disponible: <http://www.alanrevista.org>
13. Sarma. AD, Sreelakshmi. Y. Sharma. R. 1997. Capacidad Antioxidante de las antocianinas frente a la oxidación del ácido ascórbico. Departamento de Ciencias Vegetales de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Hyderabad, Hyderabad-500046, INDE. (en línea). Disponible en: <http://www.refdoc.fr>
14. Slinkard, K.; Singleton, V. 2000. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Vol. 28, No. 4. Adaptado al Departamento de Nutrición y Calidad.
15. Yáñez, G.; Zambrano, M.; Caicedo, V.; Sánchez, A.; Heredia, C. 2003. Catálogo de recursos genéticos de maíces de altura ecuatorianos, INIAP-EESC-Programa de Maíz. Quito-Ecuador

9. ANEXOS

1. VALORACIÓN Y MEDIDA DEL COLOR

(Jiménez y Gutiérrez, 2001)

Principio:

En la práctica, es interesante la determinación directa del color, por medidas espectrofotométricas. Suelen realizarse dos medidas de densidad óptica (DO) de mínimo y máximo de absorción, respectivamente del extracto extraído de la planta (*Zea mays*). El mínimo de absorción corresponde al color amarillo y el máximo al rojo característico.

Equipo y Materiales

- Balanza Analítica
- Espátula
- Espectrofotómetro UV-vis
- Balones aforados 100mL

Procedimiento:

- Realizar un barrido en el espectrofotómetro del estándar de antocianinas a las longitudes de onda entre 400-550 nm y determinar el mínimo y máximo de absorbancia.
- Determinadas las longitudes de onda respectivas, proceder a leer las absorbancias de los extractos.
- Mediante cálculos determinar la Intensidad de color, Índice de tonalidad e Índice de degradación.

Cálculos:

Intensidad de color (IC)

$$IC = DO_{\lambda \text{ máxima}} + DO_{\lambda \text{ mínima}}$$

DO = Densidad óptica (Absorbancia)

λ = Longitud de onda

Índice de Tonalidad (In T)

$$In T = \frac{DO_{\lambda \text{ mínima}}}{DO_{\lambda \text{ máxima}}}$$

Índice de degradación (InD)

$$In D = \frac{DO_{\lambda \text{ máxima}}}{DO_{\lambda \text{ mínima}}}$$

2. COLOR

(Jiménez y Gutiérrez, 2001)

Principio

El color superficial de las muestras es medido usando un colorímetro EXPECTRO COLOR, el medidor registra los valores: L (0=negro, 100= blanco), aL (+ valores= rojo, - valores= verde), y bL (+ valores= amarillo, - valores= azul). La diferencia de color total (ΔE) es calculada previamente desde los parámetros Hunter.

Materiales y Equipo

- Colorímetro
- Superficie de color blanco o negro

Procedimiento

- Seleccionar el extracto medirse.
- Colocar el extracto colorante sellado en una funda de polietileno sobre una superficie blanca o negra (baldosa).
- Colocar el prisma del ColorTec-PEXPECTRO COLOR sobre la funda con el colorante, tratando cubrir toda su superficie.
- Tomar las lecturas en diferentes zonas de la funda.
- Anotar los parámetros: L, a, b (X, Y, Z), las lecturas dividir para 100, reportar con dos decimales.

Cálculo

Para determinar el ángulo Hue (H), se parte de los parámetros medidos de a y b, mediante la siguiente ecuación:

$$H = \arctang\left(\frac{b}{a}\right)$$

$$C = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

Donde:

Tono = H = Angulo Hue

Cromaticidad = C

Claridad = L = Valor de lectura directa

3. DETERMINACIÓN DE NITRATOS (-NO₃)

(A.O.A.C., 1998)

Principio

Es una técnica basada en la interacción entre la luz y la materia. La luz es una forma de energía, que se expresa en parámetros de longitud de onda y gracias a la óptica geométrica detectamos la reflexión.

Material y Equipo

- Reflectómetro

Procedimiento

- Se prepara una solución del extracto colorante y se afora a un determinado volumen.
- Se realiza una hidrólisis, con ácido sulfúrico concentrado, con el fin de eliminar el color de modo que no interfiera en las lecturas reflectométricas, como se describe a continuación.
- A 5mg de muestra, se le añade 150 µL de ácido sulfúrico al 72%, el conjunto se deja en baño María (25°C) por 3 horas.
- Se añade 1.55 mL de agua destilada y se incuba por 2 horas a 100°C, enfriar y filtrar.
- Se toma una varilla analítica y se introduce en la muestra.
- Se presiona la tecla START del reflectómetro; se elimina el exceso del líquido de la varilla, sacudiéndola manualmente.
- Cuando suena la señal acústica (5 segundos antes del tiempo de reacción), en el adaptador de varilla se introduce la varilla hasta el tope, con las zonas de reacción en dirección a la pantalla.
- Se anota la lectura, que aparece en la pantalla expresada en mg/L

Cálculos

$$\text{mg nitratos}/100\text{g muestra} = \frac{L \times V}{P_m}$$

L = Lectura en mg/L

V = Volumen final

P_m = Peso de la muestra

4. DETERMINACIÓN DE OXALATOS

(A.O.A.C., 2006).

Principio

Los métodos espectrofotométricos se basan sobre la medida de la absorbancia a una longitud máxima de una dilución del extracto de los materiales.

La determinación de los oxalatos se hace con un extracto del ácido tungstosfórico

produciéndose la precipitación del ácido oxálico.

Equipo y Material

- Espectrofotómetro de absorción atómica
- Centrifuga

Reactivos

- Solución de permanganato de potasio
- Solución amortiguadora de acetato
- Líquido de lavado
- Ácido fosfotungstácico
- Ácido tungstosfórico
- Solución de lantano (La)
- Soluciones estándar de calcio

Procedimiento

Preparación de la solución de prueba (solución 1)

Determine el peso neto del contenido de la lata. Trasvasar cuantitativamente a alta velocidad de la licuadora, se puede enjuagar con 100 ml de H₂O añadido a partir de bureta o pipeta. Homogeneizar 15 minutos y enfriar a temperatura ambiente. Añadir H₂O para llevar el peso total de 300 g aproximadamente, a continuación, agregar 55 ml 6M HCl. Añadir 2 gotas de alcohol caprílico, y hervir 15 min. Enfriar trasvasar cuantitativamente a matraz aforado de 500 ml y filtrar, desechando los primeros 100 ml de filtrado.

Precipitación de ácido oxálico

Pipetear 25 ml de filtrado en 50 ml Erlenmeyer, añadir 5,0 ml de reactivo ácido tungstosfórico, mezclar y dejar reposar 5h. Filtrar con papel Whatman N ° 30. Pipetear 20 ml de filtrado en un tubo de para centrifuga de 50 ml y añadir gota a gota NH₄OH a un pH de 4 a 4,5, utilizando papel indicador. Añadir 5 ml de tampón con la pequeña corriente de H₂O y deje reposar durante la noche. Centrifugar 15 min a 1700, decantar. Lave completamente precipitado para irrumpir la suspensión fina con la corriente de chorro fino de 20 ml de líquido filtrado lavado en frío. Repetir la centrifugación y la decantación, teniendo cuidado de que precipitado se drene por completo. Deseche el papel. Añadir 5 ml de H₂SO₄ para precipitar. Proceda con permanganato de titulación.

Determinación por valoración de permanganato

Calentar el analito y el blanco (5 ml de H₂SO₄ en tubos para centrifuga de 50 ml) en un baño de agua hirviendo. Valorar caliente con una solución 0.002M KMnO₄ hasta que el color rosado persista 30 segundos.

La determinación por absorción atómica

Transferir el contenido total del tubo de la centrífuga a frascos de 10 ml con H₂SO₄ (1 +9) y diluir con la misma solución (solución 1). Pipetear 2 ml de solución 1 en matraz aforado de 50 ml que contenga 10,0 ml solución (La), diluir con H₂O, transferir 15,0 mL de solución a un matraz aforado de 25 ml que contiene 2 ml de solución (La). Diluir el volumen con H₂O. Pipetear 0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, y 12,0 ml de solución CaCO₃ en matraces aforados de 50 ml. Pipetear 10 ml de solución (La) en todas y diluir a volumen con H₂O.

Realizar de las pruebas y las soluciones estándar 2 lecturas antes y después de leer la prueba. Determinar la concentración de Ca de la curva estándar en $\mu\text{Ca} / \text{ml}$.

5. DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS

(Rapisarda, P; Fanella, F; Macccarone, E. 2000)

Principio

Los métodos espectrofotométricos se basan sobre la medida de la absorbancia a una longitud máxima de una dilución del extracto de los materiales, con un disolvente ácido.

La determinación de los pigmentos (antocianinas) se hace con un extracto de alcohol n-amílico acidificado. La lectura se hace a 544nm, que corresponde al espectro de máxima absorción de los pigmentos.

Materiales y Equipo

- Maíz negro
- Bureta de 50ml
- Tubos centrifuga de 50ml
- Centrifuga 3000-4000 rpm
- Pipetas volumétricas de 10ml
- Balón de 25ml con tapa esmerilada
- Espectrofotómetro
- Balanza analítica

Reactivos

- Ácido clorhídrico fumante concentración 36.5-38 %, densidad 1.19
- Ácido clorhídrico 0.1N. Tomar 8.06 ml de ácido 36.5-38 % de pureza, en un balón aforado de 1 litro y llevar a volumen con agua destilada, homogenizar bien.
- Alcohol n-amílico saturado con HCl 0.1N (mezclar 50 % alcohol n-amílico y 50 % ácido clorhídrico 0.1N)

Procedimiento

- Pesar 1 gramo de muestra (cáscara)

- Añadir 20 ml de HCl 0.1N, mezclar bien. Dejar en reposo durante una hora, mezclando ocasionalmente.
- Transferir el contenido a un tubo de centrifugación sin enjuagar.
- Centrifugar por 20 minutos a 3000 – 4000 rpm.
- Tomar 10 ml de sobrenadante ácido extraído con una pipeta y transferir a un cilindro graduado
- Añadir 10 ml de alcohol n- amílico saturado con HCl 0,1 N
- Agitar durante un minuto, transferir a un tubo de centrifuga y separar a las dos fases a 3000 – 4000 rpm durante 5 minutos

Medida espectrofotométrica

Para el reconocimiento de las antocianinas, tomar con una pipeta una cantidad suficiente de la capa superior y transferirla a la celda. Medir la densidad óptica de las muestras a 544 nm, usando alcohol n- amílico saturado con HCl 0.1 N como blanco.

Expresión de resultados

Los resultados obtenidos se expresan en valores de absorbancia obtenidos a 544nm.

6. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES

(Slinkard, K.; Singleton, V. 2000)

Principio

Los polifenoles totales se determinan mediante un método espectrofotométrico utilizando el reactivo Folin & Ciocalteu's el cual produce una coloración azul cuando reacciona con este tipo de compuestos que absorbe a una longitud de onda de 760 nm. El contenido total de polifenoles se expresa en mg de ácido gálico/100 g de muestra.

Equipo y material

- Espectrofotómetro Shimadzu UVVIS
- Balanza analítica
- Placa de agitación
- Papel filtro cualitativo
- Balones aforados
- Pipetas volumétricas
- Erlenmeyer con tapa rosca
- Vasos de precipitación

Reactivos

Solución de carbonato de sodio al 20%: Pesar 20 g de carbonato de sodio Na_2CO_3 (Merck 6268), disolver con un poco de agua destilada caliente y aforar a 100 ml.

Metanol al 70 %: Medir la densidad del metanol CH₃OH (Fisher A450-4) de 0.791 a 0.872 g/ml, con agua destilada.

Solución estándar de ácido gálico de 200 ppm: Pesar 0,023 g de ácido gálico monohidratado (HO)₃C₆H₂CO₂H.H₂O, (Aldrich 39, 822-5, 98 %) disolver y aforar a 100 ml con agua destilada.

Cuadro 11: Variación de absorbancia del Ácido gálico dependiendo de su concentración

| µg/ml | ml ácido gálico | ml agua | absorbancia |
|-------|-----------------|---------|-------------|
| 0 | 0 | 10 | 0.0524 |
| 5 | 0.25 | 9.75 | 0.0655 |
| 10 | 0.5 | 9.5 | 0.1691 |
| 40 | 2 | 8 | 0.3776 |
| 80 | 4 | 6 | 0.7340 |
| 100 | 5 | 5 | 0.9017 |
| 140 | 7 | 3 | 1.2851 |

Y= 0.0089 X

r² = 0.9992

Procedimiento

- Pesar 10 g del extracto
- Adicionar 75 ml de metanol a 70%
- Extraer inmediatamente durante 75 minutos a temperatura ambiente, bajo agitación magnética.
- Filtrar la solución sobre papel filtro y completarla con metanol a 70% a 100 ml.

Extracto bruto.

- Tomar 1 ml del extracto bruto (o 1ml de la dilución) y colocar en un tubo de ensayo, añadir 6 ml de agua destilada, 1 ml de reactivo de Folin & Ciocalteu's. Después de 3 minutos, adicionar 2 ml de una solución acuosa de carbonato de sodio al 20%.
- Colocar los tubos a 40° C durante dos minutos.
- Medir la absorbancia a 760 nm.

Cálculos

$$\text{Polifenoles}(\text{mg \acute{a}c.g\acute{a}lico/ g muestra}) = \frac{LR(\mu\text{g / ml}) * Vt(\text{ml}) * FD * 10^{-3} (\text{mg / } \mu\text{g})}{Pm(\text{g})}$$

Donde:

LR = Lectura de regresión

Vt = Volumen total

Pm = Peso de la muestra

FD = Factor de dilución

7. DETERMINACIÓN DE TANINOS

(A.O.A.C., 1998)

Principio

La determinación de taninos se realiza en una muestra libre de grasas, utilizándose un extracto acuoso el cual reacciona con el reactivo Folin-Denis en medio alcalino. Se utiliza ácido tánico como estándar y se realizan las lecturas en un espectrofotómetro UV VIS a 680 nm.

Reactivos

- Solución de Folin-Denis: Disolver 100g de wolframato de sodio deshidratado, 20g de ácido fosfomolibdico, 50 ml de ácido fosfórico, en 750 ml de agua destilada. Se calienta dos horas a reflujo, se enfría y se afora a un litro.
- Solución de carbonato de sodio saturado: En 100ml de agua destilada añadir 35g de carbonato de sodio anhidro, se disuelve en caliente a 70-80°C, se enfría una y se deja precipitar 12 horas, se coloca en la solución algunos cristales de carbonato de sodio decahidratado y luego que cristaliza se filtra a través de lana de vidrio.
- Solución estándar de ácido tánico: Preparar una solución madre de 100 ppm de ácido tánico, cada vez que se va a realizar esta determinación.

Procedimiento

- Se pesa 1 g de muestra y se extrae durante 8 horas con hexano.
- Se coloca en ebullición el residuo durante 2 horas con 300ml de agua destilada.
- Se enfría, se filtra y se diluye a 500 ml.
- Se toma alícuotas del filtrado en balones de 50 ml, se añade 2,5ml de reactivo Folin-Denis, 5 ml de solución de carbonato de sodio y se afora a 50ml con agua destilada.
- Se lee en un espectrofotómetro a 680nm, después de 30 minutos que ocurre la reacción.
- Se prepara una curva patrón de ácido tánico de 0-5 ppm, proceder desde la adición del reactivo Folln-Denis.

Cálculos

Se debe tener en consideración para los cálculos las diluciones realizadas y el peso de la muestra. Los taninos vienen expresados como Ac. Tánico y los resultados se expresan como siguen:

$$mg \text{ taninos} / g \text{ muestra} = \left(\frac{LR(\mu g / ml) \times V(ml) \times FD \times 10^{-3} (mg / \mu g)}{Pm(g)} \right)$$

Donde:

LR = lectura de regresión.

V = volumen final.

FD = Factor de dilución.

Pm = peso de la muestra.

8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

(Sarma. AD, Sreelakshmi. Y. Sharma. R. 1997)

Principio

Este método determina la capacidad que tiene un posible antioxidante para inhibir la oxidación del ácido ascórbico.

Reactivos

- Ácido ascórbico
- Agua desionizada
- Solución de cobre

Materiales y Equipos

- Espectrofotómetro

Procedimiento

Se usa 0,08 ml de la solución de Cu con 0,06 ml de la solución de ácido ascórbico (10 mM en agua desionizada), 4 ml agua y 1 mL de muestra (el blanco lleva 5 ml de agua). La velocidad de oxidación del ácido ascórbico se monitorea durante 15-30 minutos para registrar la disminución de la absorbancia a 265 nm (longitud de onda máximo del ácido ascórbico). De la diferencia entre 2 lecturas (inicial y después de 15 o 30 minutos), se plantea los siguientes cálculos:

Cálculos

$$I = (1 - \Delta B_m / \Delta B_B) * 100$$

I = Porcentaje de inhibición

ΔB_m = Diferencia de la absorbancia de la muestra

ΔB_B = Diferencia de la absorbancia del blanco