



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA



“Extracción, caracterización química y estabilidad de pigmentos obtenidos a partir de cálices de Jamaica”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

IAG. Alexandro Escobar Ortiz

Dirigido por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Querétaro, Querétaro a noviembre del 2019



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Extracción, caracterización química y estabilidad de pigmentos obtenidos a partir de cálices de Jamaica”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:

IAG. Alexandro Escobar Ortiz

Dirigido por:

Dra. Rosalía Reynoso Camacho

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Presidente

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Secretario

Dr. José Alberto Gallegos Infante
Vocal

Dr. Edmundo Mateo Mercado Silva
Suplente

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez
Suplente

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre del 2019
México

Dedicatorias.

A **dios** por permitirme disfrutar esta hermosa etapa de mi vida, por llenarme de bendiciones, por darme fuerza cuando no podía más y sabiduría a al tomar desiciones, por iluminarme en momentos difíciles, por que sin el nada de esto hubiera sido posible. A mis **padres** por ser mi gran ejemplo, por su gran apoyo incondicional, por guiar siempre mis pasos, por darme siempre mucho amor. A mi **madre** por ser. A mi **hermano** por apoyarme y ser siempre un ejemplo de vida para mi. A mi **abuela** por ser mi gran ejemplo de lucha, fe y amor. A **Cindy** por ser mi compañera incondicional, mi mayor apoyo, mi confidente, mi motivación, por las largas noches que me acompañaste en el laboratorio, por las noches de desvelo juntos, por soportar mi estrés y mi mal humor, por creer en mi, por todos tus cuidados y cariños, por millones de experiencias que hemos compartido y que nunca olvidare

Agradecimientos

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico para mi manutención durante el desarrollo de este proyecto

A carmelita por su gran apoyo, por su paciencia al realizar nuestros tramites y por recibirnos siempre con una gran sonrisa y un buen consejo

A la Dra. Rosalía Reynoso Camacho por su extraordinario apoyo paciencia, por guiar esta investigación con tanata profesionalidad, por buscar siempre mi crecimiento profesional y personal.

A los miembros de mi comité por guiar mi investigación, por compartir sus conocimientos, por su paciencia y por sus buenos consejos y palabras de aliento.

A todos mi amigos y compañeros por ser parte indispensable de mi vida y convertirse en mi nueva familia en Querétaro.

Índice general

Resumen	1
Abstract	2
I.Introducción	3
II. Antecedentes	5
2.1. Clasificación de los colorantes alimentarios	5
2.1.1 Marco Regulatorio de los colorantes alimentarios	6
2.2 Colorantes naturales o pigmentos alimentarios rojos	7
2.3 Antocianinas como fuente de pigmento rojo	7
2.3.1 Estructura química y estabilidad de las antocianinas	7
2.3.2 La Jamaica como fuentes de antocianinas	9
2.3.2.1. Estabilidad de las antocianinas de jamaica	11
2. 4 Extracción de antocianinas de fuentes vegetales	12
2.4.1 Extracción sólido-líquido	12
2.5. Estabilización de pigmentos rojos por copigmentadores	16
2.5.1 Copigmentación Natural	18
2.5.2. Copigmentación por aditivos	19
2.5.2.1 Copigmentación por aditivos - polisacáridos y proteínas	19
2.5.2.2 Copigmentación por aditivos – compuestos fenólicos	20
III. Justificación	22
IV. Objetivos	23
4.1 Objetivo General	23
4.2 Objetivos específicos	23
V. Metodología	24
5.1 Material Vegetal	24
5.2 Condiciones de extracción sólido- líquido (ESL) de pigmentos rojos	24
5.3 Estabilidad térmica y estabilidad al almacenamiento de pigmentos rojos de Jamaica	25

5.3.1. Cuantificación de antocianinas monoméricas.....	27
5.3.2 Cuantificación de fenoles totales	27
5.3.3 Cuantificación de flavonoides.....	27
5.3.4 Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides en pigmentos de Jamaica por UPLC-PDA.....	28
5.4. Mediciones de color e índice de pardeamiento.....	28
5.4.1 Medición de color.....	28
5.4.2 Índice de pardeamiento.....	29
5.5 Extracción asistida por ultrasonido (EAU).....	29
5.6 Adición de copigmentadores para aumentar la estabilidad de los pigmentos rojos de Jamaica	31
5.7. Efecto en la estabilidad en pigmentos de Jamaica por la adición de un copigmentador en diferentes concentraciones y medición del efecto hiperocrómico y batocrómico	32
5.8 Evaluación de los sistemas pigmento:copigmento en un modelo de bebidas.....	32
5.9 Análisis estadístico	33
VI. Resultados y discusiones.....	34
6.1 Eficiencia de extracción de antocianinas totales monoméricas, por sistemas de ESL.....	34
6.2 Degradación de pigmentos de Jamaica obtenidos por sistemas de ESL sometidos a diferentes temperaturas	37
6.2.1. Contenido de antocianinas	37
6.2.2. Índice de pardeamiento de pigmentos.....	41
6.3 Parámetros de color CIELAB de pigmentos de de Jamaica almacenados a diferentes temperaturas	43
6.4 Cinéticas de degradación de contenido de antocianinas modeladas con ecuaciones lineales y no lineales.....	45
6.5. Concentración de compuestos fenólicos y flavonoides totales	48
6.6. Perfil de compuestos fenólicos, flavonoides y análisis estadístico multivariado.....	49
6.7 Extracción de antocianinas de Jamaica por extracción asistida por ultrasonido (EAU).....	54
6.8 Adición de copigmentadores para incrementar la estabilidad de pigmentos de Jamaica.....	57
VII. Conclusiones	68
VIII. Referencias.....	69

Indice de figuras

Figura 1.	Estructura general de las antocianinas	8
Figura 2.	Transformaciones estructurales de la antocianina Delfinidina-3-O-Sambubiósido. EL catión flavilio en una condición fuertemente ácida a una solución acuosa alcalina	9
Figura 3.	Plantación de Jamaica en Ayutla de los libres, Guerrero	11
Figura 4.	Interacciones de apilamiento π - π en antocianinas y sus complejos.	17
Figura 5.	Diagrama de flujo de proceso de extracción y evaluación de la estabilidad térmica de pigmentos de Jamaica.	25
Figura 6.	Metodología para la extracción asistida por ultrasonido	31
Figura 7.	Factores que influyen en el rendimiento de extracción de antocianinas de Jamaica.	37
Figura 8.	Degradación de antocianinas de pigmentos de Jamaica almacenados a 4, 25, 35 y 45 °C durante 45 días y a 80 °C durante 8 horas.	40
Figura 9	Índice de pardeamiento de pigmentos de Jamaica almacenados a (4, 25, 35 y 45 °C) durante 45 días y a (80 °C) durante 8 horas.	43
Figura 10	Color de pigmentos de jamaica almacenados a 4 °C, 25 °C, 35°C y 45 °C, durante 45 días	44
Figura 11	Análisis estadístico multivariado de perfil de compuestos fenólicos y flavonoides de pigmentos extraídos de Jamaica	53
Figura 12	Rendimiento de extracción de antocianinas comparando el sistema de extracción sólido líquido (ESL) y extracción asistida por ultrasonido (EAU).	55
Figura 13	Degradación de pigmentos de Jamaica extraídos mediante ESL y EAU sometidos a 80 °C durante 5 horas.	56
Figura 14	Índice de pardeamiento de pigmentos de Jamaica extraídos mediante ESL y EAU sometidos a 80 °C durante 5 horas	57
Figura 15	Degradación de pigmentos de Jamaica adicionados con (1%) de diferentes copigmentadores y sometidos a 8 horas de degradación acelerada a 80 °C.	59

Figura 16	Efecto de la adición de ácido gálico en la estabilidad de pigmentos de Jamaica sometidos a 80 °C 8 horas	60
Figura 17.	Efecto batocrómico e hiperocrómico al adicionar ácido gálico a pigmentos de Jamaica.	61
Figura 18	Índice de pardeamiento de extractos de Jamaica, adicionados con ácido gálico a diferentes concentraciones sometidos a 80 °C a pH 3 durante 8 horas	62
Figura 19	Absorbancia a 520 nm de extractos de Jamaica, adicionados con ácido gálico a diferentes concentraciones sometidos 8 horas a 80 °C, pH 3 después de 8 horas de almacenamiento.	63
Figura 20	Efecto de la adición de ácido ascórbico en la degradación de pigmentos de jamaica a 40 °C durante 3 días de almacenamiento.	64
Figura 21	Efecto de la adición de ácido gálico en un modelo de bebidas, almacenado a 40 °C durante 3 días.	66
Figura 22	Degradación de antocianinas de pigmentos de Jamaica, con la adición de ácido gálico en un modelo de bebidas, almacenado a 40 °C durante 3 días.	67
Figura 23	Índice de pardeamiento de pigmentos de Jamaica, con la adición de ácido gálico en un modelo de bebidas, almacenado a 40 °C durante 3 días.	67

Índice de cuadros

Cuadro 1	Condiciones de extracción sólido-líquido (ESL) empleadas para obtener pigmentos de Jamaica	24
Cuadro 2	Condiciones de extracción evaluadas para EAU	30
Cuadro 3	Rendimiento de extracción de antocianinas totales monoméricas (ATM)	35
Cuadro 4	Análisis de factores que intervienen en la eficiencia de extracción de antocianinas.	36
Cuadro 5	Parametros de degradación de antocaininas de Jamaica a diferentes temperaturas, modelados por ecuaciones lineales y no lineales	48
Cuadro 6	Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT)	49
Cuadro 7	Perfil de compuestos fenólicos y flavonoides de diferentes pigmentos de Jamaica	51

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Resumen

La industria de colorantes alimentarios naturales ha crecido de manera importante en los últimos años. Sin embargo, una de las principales desventajas que reportan estos pigmentos es un bajo rendimiento de extracción y su baja estabilidad en el almacenamiento, se han utilizado la extracción asistida por ultrasonido (EAU) para incrementar la eficiencia de extracción de pigmento. Por otro lado, se ha demostrado que las antocianinas pueden estabilizarse mediante el fenómeno de copigmentación. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar condiciones de extracción, tanto convencional y EAU, que permitan incrementar la eficiencia de extracción y la estabilidad de los pigmentos de Jamaica, además de identificar los copigmentos obtenidos de cálices de Jamaica y asociarlos a una estabilidad térmica, y por último evaluar el efecto de la adición de copigmentos sobre la estabilidad de los pigmentos de Jamaica. Se encontró que la extracción con 80% de etanol, disminuyó el porcentaje de degradación de antocianinas almacenadas a 4, 25, 35, 45 y 80 °C. Por otro lado, la EAU, no mejoró la eficiencia de extracción de pigmentos de Jamaica, pero sí incrementó la degradación en un 50 %. Los extractos que mostraron una mayor estabilidad, presentaron mayor concentración de compuesto fenólicos como el ácido 4-O-cafeoilquínico, la rutina y la miricetina. La mejora en la estabilidad de los pigmentos, se atribuye a la co-extracción de compuestos que pueden actuar como copigmentadores naturales, sin embargo, algunos de estos compuestos, presentan elevados costos, por lo tanto, se evaluaron copigmentadores exógenos, siendo el ácido gálico el que mostró mejores efectos estabilizantes. La adición de ácido gálico a los pigmentos de Jamaica, mostró un fuerte efecto hipercrómico aumentando la absorbancia máxima en un 49%, además aumentó la absorbancia máxima en un 97% después de 8 horas de almacenamiento a 80 °C, incrementando la estabilidad de las antocianinas. Por lo tanto, los pigmentos de los cálices de Jamaica son más estables en solventes acidificados con mayor proporción de etanol y la adición de ácido gálico mejora esta propiedad.

Abstract

The natural food coloring industry has grown in recent years. However, one of the main disadvantages of these pigments is low extraction yield and their low storage stability. Ultrasound-assisted extraction (UAE) has been used to increase pigment extraction yield. On the other hand, it has been shown, that anthocyanins can be stabilized by the phenomenon of copigmentation. Therefore, the purpose of this work was to identify extraction conditions, both conventional and UAE, which could increase the extraction efficiency and stability of roselle pigments, as well as, to identify the co-pigments of roselle and associate them with thermal stability, and finally evaluate the effect of addition co-pigments on the stability of roselle pigments. It was found that extraction with 80% ethanol decreased the degradation percentage of stored anthocyanins at 4, 25, 35, 45 and 80 °C. On the other hand, the UAE did not improve the efficiency of pigment extraction of roselle, but it did increase degradation by 50%. The pigments with greater stability, have the highest concentration of phenolic compounds, such as 4-O-caffeoylquinic acid, rutin and myricetin. The improvement in the pigment stability is attributed to the co-extraction of compounds that can act as natural co-pigment, however, some of these compounds have high costs, therefore, exogenous co-pigments were evaluated, it was gallic acid that showed better stabilizing effects. The addition of gallic acid to the pigments of roselle showed a strong hyperchromic effect increasing maximum absorbance by 49%, and increased maximum absorbance increase by 97% after 8 hours of storage at 80 °C, improving the anthocyanins stability Therefore, roselle calyx pigments are more stable in acidified solvents with a higher proportion of ethanol and the addition of gallic acid improves this property.

I.Introducción

El mercado mundial de los colorantes alimentarios es un mercado en constante crecimiento con un 10 a un 15% anual (IFT, 2016), de estos, el segmento de los colorantes alimentarios naturales o pigmentos ha mostrado especial importancia en los últimos años. Esta tendencia es consecuencia de los efectos negativos relacionados al consumo de colorantes sintéticos, entre los que destaca la hiperactividad, efectos mutagénicos y reacciones alérgicas, aunque estos efectos sólo son causados en dosis que regularmente no alcanza un consumidor promedio (Cortez *et al.*, 2017).

Con base a lo anterior, existe una tendencia a la búsqueda de fuentes de colorantes naturales. Las antocianinas son pigmentos rojos solubles en agua, ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Una fuente de estos pigmentos es la flor de Jamaica (*Hisbicus sabdariffa*). A nivel mundial México ocupa el 7° lugar de producción de Jamaica, sin embargo, una cantidad importante de dicha producción no cumple con las características de calidad para ser comercializada y esta podría ser utilizada para la extracción de antocianinas. El contenido de antocianinas de la flor de Jamaica se ha reportado entre 1.7 y 2.5 % de su peso seco y se han identificado a la Delifinidina 3-O-Sambubiósido y la Cianidina 3-O-Sambubiósido como sus antocianinas mayoritarias (Da-costa-Rocha *et al.*, 2014).

Los estudios de extracción de antocianinas de Jamaica indican que los solventes agua y agua con ácido fórmico fueron 50 % más eficientes para extraer antocianinas, que el metanol y el metanol con ácido fórmico, incrementándose ligeramente el rendimiento de extracción conforme se incrementa la temperatura de extracción (Sindi *et al.*, 2014).

Por otro lado, para mejorar dichas eficiencias de extracción de antocianinas, se recomienda el uso de tecnologías emergentes como el ultrasonido, el cual facilita la hidratación de los tejidos vegetales, ocasionando poros en la pared celular y en algunas ocasiones lisa la pared celular, lo cual ayuda a la transferencia de solvente incrementando la eficiencia de extracción de compuestos de interés, como las

antocianinas (Golmohamadi *et al.*, 2013). Se ha reportado que los cálices de Jamaica sometidos a diferentes condiciones de ultrasonido se mejora el rendimiento de las antocianinas hasta un 300 %, sin embargo, la estabilidad de estos compuestos no ha sido evaluada.

En cuanto a los estudios realizados con antocianinas de Jamaica extraídas con una mezcla de solventes se reportó que estas son inestables a pH poco ácidos y a altas temperaturas (Wu *et al.*, 2018). La inestabilidad de estas antocianinas se atribuye a que son antocianinas no aciladas (Trouillas *et al.*, 2016). Sin embargo, dicha estabilidad puede ser mejorada con la adición de algunos compuestos llamados copigmentadores, los cuales forman complejos no covalentes con las antocianinas, entre estos destacan los polisacáridos, ácidos fénolicos y flavonoides (Trouillas *et al.*, 2016; Cortez *et al.*, 2017).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue extraer pigmentos de cálices de Jamaica combinando un sistema sólido-líquido en medio ácido con una extracción asistida por ultrasonido y evaluar el efecto de copigmentadores sobre la estabilidad de dichos pigmentos.

II. Antecedentes

Un aditivo de color o colorante alimentario es cualquier colorante, pigmento u otra sustancia que imparte color a algún alimento, bebida o alguna aplicación no alimentaria, adicionalmente un aditivo de color puede ser cualquier químico que reacciona con otra sustancia y causa la formación de color. Los colorantes en alimentos son usados para mejorar la apariencia en una gran variedad de alimentos y bebidas (Amchova *et al.*, 2015).

Las principales razones por la que se usan colorantes alimentarios son:

- 1.- Compensación de pérdida de color a causa de la exposición a la luz, aire, temperatura y condiciones de almacenamiento.
- 2.- Mejorar el color natural del alimento para hacer el alimento más atractivo y apetecible.
- 3.- Proporcionar color a alimentos con poco color (Barrows *et al.*, 2003).

2.1. Clasificación de los colorantes alimentarios

Los colorantes alimentarios pueden ser clasificados de acuerdo diversos criterios; sin embargo, la clasificación más usada es la de colorantes no solubles y solubles.

Los colorantes no solubles, son colorantes muy estables con buenas propiedades de cubierta, son insolubles en disolventes comunes, pueden ser de origen inorgánico con una limitada variedad de colores disponibles como ejemplo el dióxido de titanio (blanco), óxido de hierro (rojo) y carbón activado (negro). Los colorantes no solubles orgánicos generalmente se encuentran en formas de lacas, que son complejos insolubles de sales y colorantes solubles en una gran variedad de colores (Amchova *et al.*, 2015).

Los colorantes solubles pueden dividirse en sintéticos, semi-sintéticos y naturales. Los colorantes sintéticos son producidos mediante síntesis química pero no pueden ser encontrados en la naturaleza, generalmente poseen un color más intenso y

permanente que los colorantes naturales, no imparten sabor en los productos que se aplican y son generalmente más estables. Los colorantes semi-sintéticos son similares a los naturales, pero son producidos mediante síntesis química. Los colorantes naturales son obtenidos de diversos materiales naturales, entre estos se incluyen la riboflavina (E101), clorofila (E140), carotenos (E160a), betalainas (E162) y antocianinas (E163). Los colorantes naturales originalmente son muy poco estables y se caracterizan por su actividad fisiológica. (Amchova *et al.*, 2015).

2.1.1 Marco Regulatorio de los colorantes alimentarios.

El Codex Alimentarius (CA) es el más alto organismo internacional en materia de legislación alimentaria, es un organismo subsidiado por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). El CA maneja el Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos (CCFAC, por sus siglas en inglés), este establece o ratifica dosis máximas permitidas o niveles de referencia para los distintos aditivos alimentarios incluidos contaminantes ambientales y sustancias tóxicas presentes en los alimentos. En cuanto a la Unión Europea (UE), los aditivos son revisados por la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés). La aprobación de los aditivos en alimentos depende del nivel de conocimiento científico disponible, y estas conclusiones deben periódicamente revisarse conforme surge nuevo conocimiento científico. Existen diferentes indicadores de la toxicidad de los colorantes alimentarios el más común es la Ingesta Diaria Admisible (IDA) expresada en mg del aditivo por kg de peso corporal, esta cantidad indica la cantidad de un aditivo que se puede consumir a diario durante toda la vida sin generar un riesgo a la salud del consumidor (Amchova *et al.*, 2015; Duffus *et al.*, 2007).

2.2 Colorantes naturales o pigmentos alimentarios rojos

Las frutas y vegetales están coloreados de una forma natural principalmente por cuatro grupos de colorantes. Los colorantes extraídos de fuentes naturales, también llamados pigmentos; clorofilas, carotenoides, antocianinas y betalainas, pueden ser extraídos e incorporados a otros productos alimenticios. El empleo de pigmentos alimentarios, es una tendencia actual debido a la preocupación de los consumidores sobre la seguridad de los colorantes artificiales además de los efectos biológicos positivos atribuidos a los pigmentos naturales; sin embargo, el uso de pigmentos naturales implica diversos desafíos ya que generalmente son menos estables que sus contrapartes artificiales y ofrecen una menor gama de matices (Rodríguez-Amaya, 2015).

En los últimos años, el mercado de la industria de colorantes alimentarios ha crecido rápidamente y se espera que siga creciendo entre un 10% y un 15% anual (IFT, 2016). El uso de pigmentos alimentarios naturales ha aumentado en alimentos y bebidas como sustitutos de sus equivalentes sintéticos. Esto se debe principalmente a la creciente conciencia de los peligros ambientales y los posibles efectos secundarios de los productos químicos utilizados en la síntesis de colorantes alimentarios (Cortez *et al.*, 2017; Carocho *et al.*, 2014). De acuerdo a un estudio realizado por Mintel en 2017, 77% de los nuevos productos lanzados en Latinoamérica utilizan color de origen natural (Sensient food colors, 2018).

2.3 Antocianinas como fuente de pigmento rojo

2.3.1 Estructura química y estabilidad de las antocianinas

Las antocianinas son un grupo de pigmentos solubles en agua, son compuestos fenólicos responsables del color rojo, azul y púrpura de tallos, hojas, flores, frutas y vegetales, son glicósidos o acil-glicósidos de las antocianidinas. Las antocianidinas son derivados oxigenados del catión flavilio que tiene dos anillos aromáticos (A y B), separados por un anillo heterocíclico (C) (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009), las antocianidinas más abundantes son cianidina, delphinidina, pelargonidina, malvidina

y petunidina (Trouillas *et al.*, 2016). La estructura química de las antocianinas se muestra en la Figura 1.

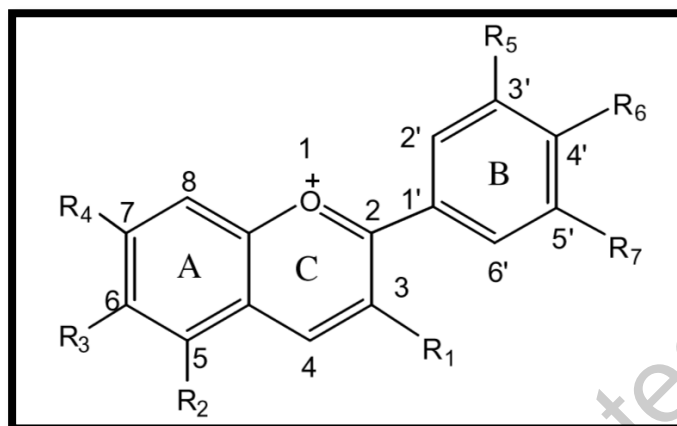


Figura 1. Estructura general de las antocianinas

El color de las antocianinas depende de sus sustituyentes, en condiciones ácidas el color de las antocianinas está en función de la sustitución del anillo B de la aglicona. El aumento en las sustituciones del grupo OH en el anillo B da como resultado un aumento en el máximo de la absorbancia produciendo un desplazamiento a tonos azules. En general se ha reportado que las antocianinas aciladas son más adecuadas para aplicaciones alimentarias ya que éstas suelen ser más estables (Zhao *et al.*, 2017; Giusti & Wrolstad 2003).

Las antocianinas son capaces de absorber luz en el rango ultravioleta y visible del espectro, desde regiones amarillas, naranjas hasta azules y verdes. Con solo un cromóforo, el núcleo flavilio, las antocianinas pueden proveer un gran rango de colores, a causa de las interacciones con otros compuestos en un medio acuoso a través del fenómeno de la copigmentación.

Las antocianinas son altamente inestables a factores como el pH, la luz y la temperatura (Trouillas *et al.*, 2016). Las reacciones químicas de las antocianinas que tienen lugar en soluciones acuosas, de acuerdo a diferentes condiciones ácido-base, hidratación y reacciones tautoméricas fueron establecidas por Brouillard *et al.*, (1977). Las especies de la antocianina Delfinidina-3-O-sambubiósido que se pueden encontrar en soluciones acuosas, ácidas y neutras se presentan en la

Figura 2, de acuerdo a Grajeda-Iglesias *et al.*, (2016). El catión flavilio, (AH⁺) es la especie predominante en equilibrio en condiciones fuertemente ácidas. Con un incremento en el pH, (AH⁺) se somete paralelamente a dos tipos de reacciones: desprotonación a la forma base quinoidal (A), y hidratación en el C-2 o C-4, seguido por la pérdida de protones para llegar a la forma hemiacetal (B). La *trans*-retrochalcona (C_{trans}) es resultado de la desacetilación de la forma hemiacetal B, y la *cis*-retrochalcona (C_{cis}), de la isomerización de C_{trans}. El intercambio entre las especies anteriores produce grandes cambios en el color y en la estabilidad de las antocianinas (Trouillas *et al.*, 2016).

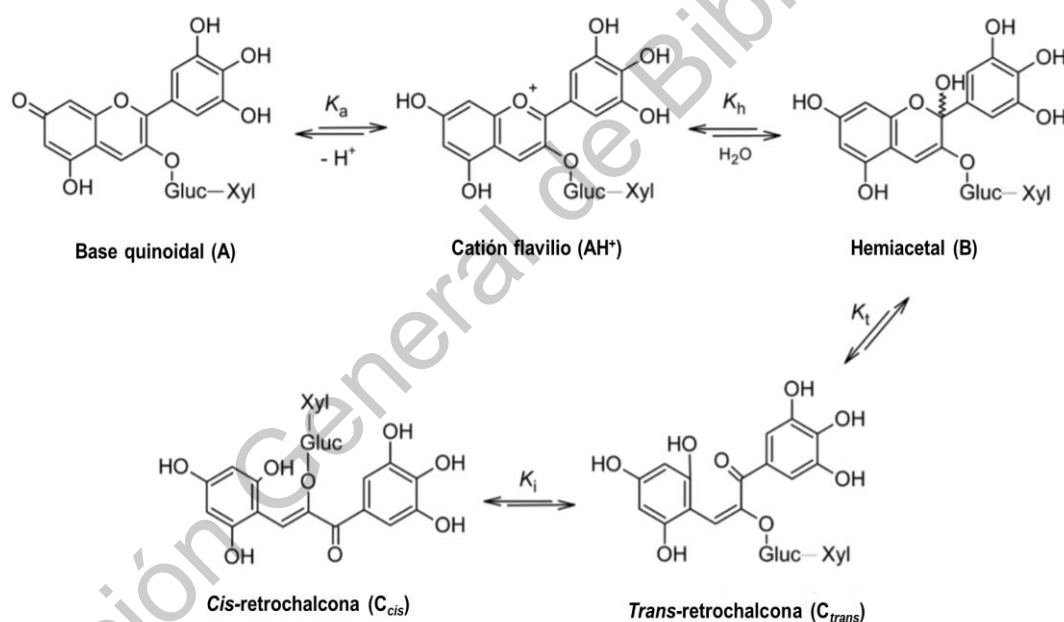


Figura 2. Transformaciones estructurales de la antocianina Delfinidina-3-O-Sambubiosido. EL catión flavilio en una condición fuertemente ácida a una solución acuosa alcalina (Adaptado de Grajeda-Iglesias *et al.*, 2016).

2.3.2 La Jamaica como fuentes de antocianinas

Hibiscus sabdariffa también conocida como “Roselle” o flor de Jamaica en México es un cultivo ideal para países en desarrollo, ya que crece con relativa facilidad en

climas áridos. A nivel mundial México ocupa el 7° lugar de producción de este cultivo, en México la Jamaica se cultiva en los estados de Oaxaca, Michoacán, Colima, Veracruz y Guerrero; siendo este último el estado que ocupa el primer lugar a nivel nacional con aproximadamente el 80 % de la producción total (SAGARPA, 2012).

A pesar de que a la flor de Jamaica se le han atribuido diversos efectos benéficos a la salud como actividad antioxidante (Lin *et al.*, 2012), control de enfermedades crónico-degenerativas, como la obesidad (Carvajal-Zarrabal *et al.*, 2013) y síndrome metabólico (Gurrola-Díaz *et al.*, 2010), el valor agregado que se le da a este cultivo en el país es bastante limitado, aunado a esto, existen diversos problemas de calidad en el producto, ya que debido a características visuales y físicas, parte de la producción no cumple los requerimientos para ser comercializado, representando una gran oportunidad para generar productos de valor agregado a partir de este cultivo.

Los cálices de Jamaica (Figura 3) contienen diversas sustancias bio-activas o fitoquímicos entre los cuales destacan las antocianinas, con un contenido aproximado del 2.5 al 3% de su peso seco y se han identificado a la Delfinidina 3-Sambubiósido y la Cianidina 3-Sambubiósido como las antocianinas mayoritarias de los extractos de Jamaica (Da-costa-Rocha *et al.*, 2014). Lo anterior demuestra que las flores de Jamaica son una fuente económica para la obtención de antocianinas, con potencial de ser usadas como colorante natural, con beneficios a la salud (Grajeda-Iglesias *et al.*, 2016).



Figura 3. Plantación de Jamaica en Ayutla de los libres, Guerrero

2.3.2.1. Estabilidad de las antocianinas de jamaica

Estudios recientes como el llevado a cabo por Wu *et al.*, (2018) han evaluado la estabilidad del color y de las antocianinas de extractos de Jamaica a pH y temperatura, donde extractos de jamaica al 5% fueron diluidos en soluciones buffer con un pH del 1-7 y degradados a temperaturas entre los 70-90 °C, se reportó que el contenido de antocianinas totales de los cálices deshidratados fue de 361.9 mg eq Cianidina 3-Glucósido/100 g. Además, las antocianinas de Jamaica mostraron velocidades más altas de degradación a pH ligeramente ácido y estas antocianinas presentaron cierto grado de resistencia a la temperatura en ambientes fuertemente ácidos.

Sinela *et al.*, (2017) determinaron las cinéticas de degradación de antocianinas de Jamaica a temperaturas de 4 a 37 °C durante 60 días, las cuales demostraron que la antocianina Delfinidina 3-Sambubiósido mostraba tasas de degradación significativamente más altas que la de la Cianidina 3-Sambubiósido, ya que el valor de la constante cinética de degradación “K” obtenido fue de $9.2 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ y $8.4 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ a 37 °C, respectivamente.

Se han reportado cinéticas de degradación de antocianinas de Jamaica donde se han evaluado a temperaturas de (60-100 °C) donde se encontró que las tasas de degradación eran de primer orden y aumentaban de forma considerable conforme aumentaba la temperatura (Domínguez-López *et al.*, 2008).

Con base a lo anterior, se identifica una necesidad de desarrollar métodos para aumentar la estabilidad térmica durante el almacenamiento de los pigmentos extraídos de la Jamaica.

2. 4 Extracción de antocianinas de fuentes vegetales

Las antocianinas se depositan en las vacuolas de las células de diferentes tejidos como hojas, pétalos, tallos y bulbos (Stintzing & Carle, 2004).

Uno de los problemas con la manipulación de las antocianinas es que son altamente sensibles a la degradación, esta característica es mayor cuando éstas se encuentran aisladas. Muchos factores fisicoquímicos determinan la estabilidad de las antocianinas y el conocimiento de estos factores es determinante para su correcta extracción y estabilización (Silva *et al.*, 2017).

2.4.1 Extracción sólido-líquido

2.4.1.1 Solventes para la extracción de antocianinas

Se necesitan procesos de extracción que permitan a los solventes atravesar la membrana celular y extraer las antocianinas, este proceso se llama extracción sólido-líquido (ESL), este es un método común para obtener antocianinas usando solventes polares como metanol, etanol y agua (Metivier *et al.*, 1980). Muchos parámetros han sido reportados que afectan el proceso de ESL como lo es el solvente, la temperatura, el tiempo de extracción y el tamaño de partícula (Castañeda-Ovando, 2009).

Se ha estudiado el efecto del uso de diferentes solventes (metanol, etanol, agua y ácido clorhídrico) y de los ácidos (cítrico, acético, propiónico, tartárico y fórmico) en el rendimiento de extracción de antocianinas de orujo de uva; encontraron que el metanol fue el solvente más efectivo, ya que tuvo un rendimiento 73% superior

comparado con el agua. La combinación de metanol con ácido cítrico fue la mejor combinación para obtener un mayor rendimiento en la extracción de antocianinas (Metivier *et al.*, 1980).

La extracción de antocianinas de mora azul con diferentes solventes no acidificados, mostró que los mejores solventes fueron: etanol y acetona, y éstos fueron significativamente más efectivos que el isopropanol, metanol y acetonitrilo. Sin embargo, el rendimiento de extracción se incrementó de manera importante al acidificar el solvente, el mejor resultado se logró con ácido trifluoroacético, específicamente mezclado con metanol y etanol (Barnes *et al.*, 2009).

En cuanto a la evaluación de solventes para la extracción de antocianinas de Zarzamora, Dai *et al.*, (2009) investigaron el efecto de diferentes mezclas de agua: etanol siguiendo las proporciones 0/100, 10/90, 25/75, 50/50, 75/25, 90/10, y 100/0, sobre la extracción de antocianinas de zarzamora variedad "Black Satin", los extractos obtenidos usando solventes con un 0–50% de agua, mostraban niveles similares de antocianinas y capacidad antioxidante, mientras que los extractos obtenidos con solventes con un contenido de agua por arriba del 50%, el contenido de capacidad antioxidante, antocianinas y fenoles totales disminuyó considerablemente, por lo que seleccionar un solvente adecuado es crítico para el desarrollo de protocolos de extracción de pigmentos.

2.4.1.2 Temperatura para la extracción de antocianinas

La sensibilidad a la temperatura es una característica generalizada en las antocianinas y por lo tanto este factor debe tomarse en cuenta en el protocolo de extracción (Silva *et al.*, 2017).

Es importante recalcar que, aunque existe diversa información sobre el efecto de la temperatura y la eficiencia de extracción, no existe información sobre el efecto de la temperatura de la extracción en Jamaica y la relación que tiene sobre la estabilidad de los pigmentos extraídos.

2.4.2. Extracción asistida por ultrasonido

Para convertir los colorantes de base biológica en alternativas reales y eficientes a los análogos artificiales ampliamente utilizados, es necesario encontrar fuentes prometedoras para su extracción y desarrollar procesos de recuperación sostenibles. Hoy en día, varias tecnologías están disponibles para mejorar la extracción, incluido el ultrasonido (López *et al.*, 2018). La extracción asistida por ultrasonido (EAU) brinda beneficios significativos sobre los métodos de calentamiento convencionales en términos de tiempo y consumo de solvente y rendimiento de extracción (Chemat *et al.*, 2017; Marić *et al.*, 2018). Esta técnica de procesamiento "verde" también reduce el consumo de energía y agua, permite el reciclaje de subproductos a través del biorefinado y garantiza un producto seguro y de alta calidad (Chemat *et al.*, 2017). Además, la EAU ha sido reconocida como apta para aplicaciones industriales (Vilkhu *et al.*, 2008).

La extracción asistida por ultrasonido (EAU) en un rango de 20-100 KHz puede ayudar a romper las células de las matrices vegetales por efecto de la cavitación y esto facilitar los procesos de extracción de compuestos de interés, sin embargo la aplicación de ultrasonido puede causar un incremento en la temperatura, lo que puede aumentar la degradación de las antocianinas tal como lo demuestra Golmohamadi *et al.*, (2013), ya que reportaron que las frecuencias de alta intensidad de 20 kHz, después de 10 min de extracción, mostraron una menor concentración de antocianinas totales en el jugo de frambuesa. Sin embargo, Vieira *et al.*, (2013) reportó un incremento de antocianinas totales monoméricas extraídas después de 180 min de la pulpa de jussara a una frecuencia de 40 KHz.

En un estudio llevado a cabo por Reátigui *et al.*, (2014), los rendimientos globales de extracción asistida por ultrasonido, de componentes antioxidantes de zarzamora (*Rubus sp.*) las variables de operación fueron: presión, temperatura, potencia de ultrasonidos y cosolvente. Con respecto a las antocianinas, el uso de agua como cosolvente resultó en un aumento significativo de la eficiencia de extracción. Asimismo, se identificaron y cuantificaron cuatro antocianinas principales mediante

cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC). Se identificaron y cuantificaron dos antocianinas principales (3-O-glucósido de cianidina y 3-O-rutinósido de cianidina) y dos antocianinas minoritarias (3-O- (6-dioxalil-glucósido de cianidina) y 3-O- (6-malonil-glucósido de cianidina). La naturaleza polar del agua y el etanol y la acidificación de la mezcla de solventes ayudaron a la solubilización de las antocianinas.

Por otro lado, en un estudio realizado por Ivanovic *et al.*, (2014), se llevó a cabo una extracción asistida por ultrasonido para investigar el aislamiento de extractos que contienen antocianinas de la variedad de zarzamora "Cacanska Bestrna. Se investigó la influencia del tiempo de sonicación y la temperatura sobre el rendimiento, el contenido de sustancias activas y la actividad antioxidante de los extractos aislados de la pulpa de moras. La extracción asistida por ultrasonido con etanol acidificado a temperatura ambiente y temperatura moderadamente alta, a 40 °C permitió el aislamiento rápido (15-30 min) de extractos de zarzamoras que contenían antocianinas, se lograron altas concentraciones de antocianinas en los extractos (5.3-6.3%). Esta técnica demostró ser eficaz para el aislamiento fácil y rápido, y con altos rendimientos de antocianinas de la zarzamora variedad "Cacanska Bestrna".

En cuanto a la aplicación de extracción asistida por ultrasonido de pigmentos de Jamaica, Pinela *et al.*, (2019) compararon y optimizaron por el método de superficie de respuesta, la extracción convencional y la extracción asistida por ultrasonido de antocianinas de Jamaica. Logrando incrementar hasta 3 veces el rendimiento de extracción de antocianinas de Jamaica usando la extracción asistida por ultrasonido comparándola con la convencional.

Si bien se ha usado la extracción asistida por ultrasonido para incrementar el rendimiento de extracción de antocianinas de Jamaica, no se ha evaluado la estabilidad de las mismas, algo que es fundamental para su aplicación como colorante de alimentos. Por lo que en este trabajo se propone determinar el efecto

de la EAU, tanto en la eficiencia de extracción de pigmentos, como en la estabilidad de los mismos.

2.5. Estabilización de pigmentos rojos por copigmentadores

En la naturaleza las antocianinas son extremadamente inestables y susceptibles a la degradación por factores externos, como el pH, temperatura, luz, oxígeno y la presencia de iones metálicos entre otros factores. El procesamiento térmico es el método de conservación más utilizado en la producción de bebidas industriales. Sin embargo, el tratamiento térmico puede causar pérdida organoléptica y nutricional, lo que conduce a una disminución de la capacidad antioxidante y otros efectos sobre las bioactividades. La decoloración del color y la formación de sabor desagradable limitan la vida útil de los productos comerciales que contienen antocianinas (Wu *et al.*, 2018). La estabilización de antocianinas sigue siendo un desafío importante y constituye un tema importante para la industria del colorante alimentario (Cortez *et al.*, 2017). Como ya se mencionó, una limitación al utilizar antocianinas como pigmento alimentario es que varios parámetros fisicoquímicos influyen en la estabilidad de las éstas, como el pH del producto, la exposición a la luz, la temperatura y la formación de complejos con otros compuestos en la matriz, lo que puede provocar la decoloración o la modificación del color esperado (Cortez *et al.*, 2017; Sui *et al.*, 2014).

Existe un proceso natural basado en la formación de complejos moleculares no covalentes llamado copigmentación. El cual es un mecanismo por el cual los colores son modulados y estabilizados en flores, frutas y vegetales, así como en alimentos. Es un termino comúnmente reservado para las antocianinas ya que pueden formar enlaces supramoleculares fácilmente con otros pigmentos y cofactores (llamados en este caso copigmentos) entre los que destacan

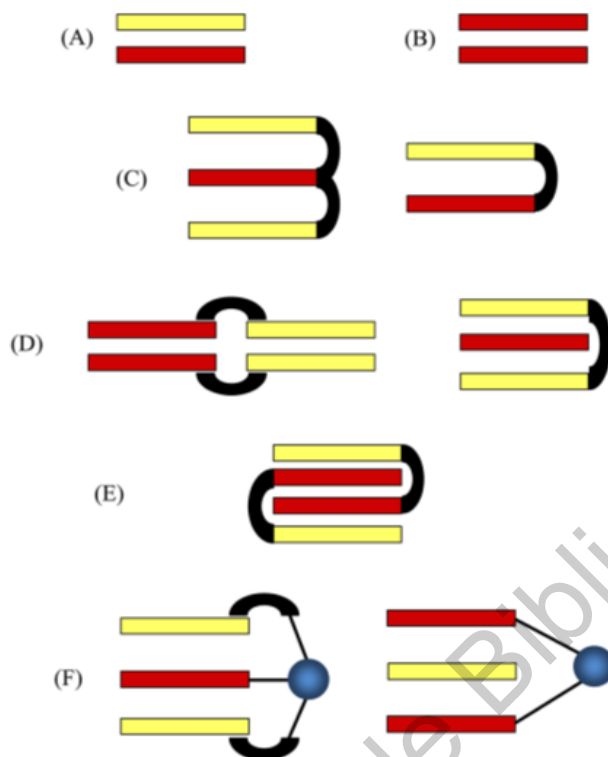


Figura 4. Interacciones de apilamiento π - π en antocianinas y sus complejos.

(A) Copigmentación intermolecular, (B) Auto-asociación, (C) Copigmentación intramolecular en antocianinas aciladas, (D) Auto asociación en antocianinas aciladas, (E) Intercalación en copigmentación intermolecular y (f) Copigmentación en complejos metal-antocianina.

polisacáridos, ácidos fenólicos y flavonoides. El fenómeno anterior es responsable de una parte importante de la variedad de colores que podemos observar en la naturaleza y de la estabilización del color. Lo que ha generado un interés creciente en la industria alimentaria por entender, usar y controlar la copigmentación (Trouillas *et al.*, 2016).

Existen más de 10,000 compuestos con potencial para ser usados como copigmentos, característica importante de los copigmentos es que posean sistemas π conjugados lo que favorece las interacciones de apilamiento π - π , y los compuestos que tienen grupos donantes y receptores de enlaces de hidrógenos como los grupos OH. La principal fuerza impulso de la unión pigmento- copigmento

es el efecto hidrofóbico. Los mecanismos por los cuales las antocianinas interactúan entre ellas y con otros compuestos en el fenómeno de la copigmentación se puede apreciar en la Figura 4. Se ha reportado el uso de varios compuestos como copigmentadores; flavonoides, polisacáridos, metales o incluso otras antocianinas, con el fin de reducir la degradación del color, y dicha copigmentación da como resultado un aumento en la absorbancia y un color generalmente más estable a lo largo del tiempo (Trouillas *et al.*, 2016).

Para fines prácticos de esta investigación clasificaremos al fenómeno de la copigmentación en dos, la copigmentación natural y la copigmentación por aditivos, los cuales se abordarán con intención de usar este fenómeno para incrementar la estabilidad de los pigmentos de Jamaica.

2.5.1 Copigmentación Natural

La estabilidad de los pigmentos rojos que contienen antocianinas se puede atribuir a dos principales motivos, uno de ellos es la acilación, la cual mejora la estabilidad de las antocianinas mediante la protección del cromóforo mediante la copigmentación intramolecular (Zhao *et al.*, 2017). Otro factor es la copigmentación como se mencionó en la sección 2.5. Sin embargo, esta puede ocurrir al agregar un copigmentador directamente a un extracto rico en antocianinas, o puede ocurrir de manera natural al co-extraer compuestos fenólicos incoloros de la misma matriz vegetal pero que protegen a las antocianinas a través de fenómenos de copigmentación intermolecular; los copigmentos incoloros contribuyen a reducir las reacciones degradativas de las antocianinas (Trouillas *et al.*, 2016).

Ejemplo de la copigmentación natural es el trabajo realizado por Gordillo *et al.*, (2018). Donde se estudió la estabilidad de distintos pigmentos ricos en antocianinas, ya sea extractos sin purificar o purificados con fase sólida C18, estos fueron extraídos de piel de uva de las variedades; “Tempranillo”, “Syrah”, “C. Sauvignon”, y “Graciano”, se evaluaron en un sistema modelo de jugos ajustado a pH 3.5, durante 17 días a 25 °C en la obscuridad. Como resultados, obtuvieron que la purificación moduló la proporción de pigmento:copigmento, esta proporción se

relacionó fuertemente con la variabilidad del color perceptible de los pigmentos con diferentes estabilidades. Las cinéticas de degradación mostraron que los pigmentos sin purificar fueron más estables que los purificados, los extractos que mostraron una mayor estabilidad, fueron obtenidos de las variedades (“Tempranillo” y “Syrah”). ya que estas variedades son más ricas en flavonoides que actuaron como copigmento natural.

2.5.2. Copigmentación por aditivos

El fenómeno de copigmentación por aditivos consiste en la adición de compuestos exógenos, lo cuales pueden generar un color más brillante y estable, en cuanto a los copigmentadores adicionados por su naturaleza, estos se dividen en polisacáridos y proteínas y compuestos fenólicos.

2.5.2.1 Copigmentación por aditivos - polisacáridos y proteínas

Las gomas son definidas como polisacáridos, de cadena larga y alto peso molecular que pueden ser o no ramificadas. Son hidrofílicas, producen soluciones o mezclas viscosas y pueden generar geles. Son extraídas de plantas o por procesamiento microbiológico (Pasquel, 2001).

Chung *et al.* (2016) evaluaron el efecto de la goma arábica (GA) en sistemas de bebidas con contenido de ácido ascórbico. Los sistemas de bebidas que contenían 0% a 5% de GA (según la prueba), 0,025% de antocianinas de zanahoria morada, 0,05% de ácido ascórbico y 0,01% de iones de calcio. El pH de los sistemas mixtos se ajustó a pH 3,0 y todas las muestras se almacenaron durante 5 días a 40 °C con exposición a luz blanca suave. Los resultados demostraron que la adición de GA (0.5% a 1.5%) estabilizó el color, y el producto más estable durante el almacenamiento se observó en la solución que contenía 1.5% de GA. Sin embargo, concentraciones de GA del 2.5% al 5.0% mostraban una menor estabilidad comparada con el tratamiento de GA a 1.5%.

En un estudio realizado por Guan y Zhong (2015), se evaluó la estabilidad térmica de soluciones de antocianinas y goma arábica a pH de 5.0 y sometidas a un calentamiento de 80 y 126 °C por 80 min, la adición de 10 mg/L presentó un

incremento en la vida media de las antocianinas de 2.0 y 1.8 veces respectivamente para las temperaturas evaluadas.

En cuanto a proteínas y péptidos, Chung *et al.*, (2017) evaluaron su efecto en la estabilidad de antocianinas de zanahoria morada, en un modelo de bebidas, y encontraron que la adición del aminoácido L-triptófano, el tiempo de vida media de las antocianinas incrementaba de 2 a 6 días, también a través de experimentos de fluorescencia encontraron que existen posibles interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrogeno entre las antocianinas y L-triptófano.

En otro estudio de Chung *et al.*, (2015) exploraron el efecto de la adición de cuatro polímeros (pectina cítrica, pectina de betabel, proteína de suero de leche y proteína de suero de leche desnaturalizada) al 1% sobre la inhibición de la degradación de antocianinas de zanahoria morada después de ser sometidas a 40 °C durante 7 días en un modelo de bebidas, encontrando que la adición de la proteína desnaturalizada de suero de leche mejoraba la estabilidad de las antocianinas durante el almacenamiento.

Por otro lado, He *et al.* (2015), reportaron interacciones de la antocianina Malvidina 3-O-Glucósido y α y β caseína, encontrando que estos compuestos interactúan con la antocianina vía hidrofílica (Fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno), y mediante interacciones hidrofóbicas. Las interacciones anteriores parecen tener un efecto positivo en la estabilidad de las antocianinas.

2.5.2.2 Copigmentación por aditivos – compuestos fenólicos

En cuanto a la copigmentación por compuestos fenólicos, Chung *et al.*, (2016) evaluaron el potencial de la saponina y de los polifenoles (vainillina, galato de epigallocatequina, extracto de té verde y ácido protocatecuico) para inhibir la pérdida del color de las antocianinas en un modelo de bebidas. Encontraron que la adición de polifenoles (0.2%) retrasó la disminución del color, observándose la mejoría más notable con la adición de extracto de té verde. La vida media de las antocianinas aumentó de 2,9 a 6,7 días con extracto de té verde. Las mediciones de fluorescencia mostraron que el extracto de té verde contenía componentes que interactuaban con las antocianinas probablemente a través de interacciones hidrofóbicas.

Por otro lado, en el trabajo de Qian *et al.*, (2017) investigaron el efecto de la adición de los ácidos gálico, ferúlico y cafeico en la intensificación de color y la estabilidad de las antocianinas de camote morado. Encontrando que la adición de ácidos fenólicos incrementaba la intensidad de color de un 19 a un 27%.

En cuanto a la flor de Jamaica, Grajeda-Iglesias *et al.*, (2016) realizó experimentos de copigmentación, se purificó a la antocianina mayoritaria (Delfinidina-3-O-Sambubiósido) de un extracto de Jamaica, y se preparó una solución a la concentración de 8×10^{-5} M, a la cual se le adicionó ácido clorogénico como copigmentador, el cual se encuentra de manera natural en los extractos de jamaica, se prepararon diferentes proporciones molares de pigmento:copigmento, encontrando que con la adición de ácido clorogénico se podía lograr un efecto hiperocrómico del 68% y un ligero cambio en la longitud de onda donde se tiene la máxima absorbancia, efecto batocrómico, cambiando de 523 a 531 nm.

Todo lo anterior demuestra que existen compuestos que pueden incrementar la estabilidad de las antocianinas, algo fundamental para una aplicación como colorantes para alimentos. Por lo que en este trabajo se evaluó la adición de copigmentadores, tanto polisacáridos, proteínas, péptidos y compuestos fenólicos y se determinó su efecto en la estabilidad de los pigmentos de Jamaica.

III. Justificación

El mercado de colorantes alimentarios está en constante crecimiento y la tendencia es el remplazo de los colorantes sintéticos por pigmentos naturales, además de que existe una necesidad de encontrar fuentes de pigmentos rojos estables. Dentro de las opciones para extraer pigmentos rojos se encuentran los cálices de Jamaica, el cual es una matriz vegetal rica en pigmentos rojos (antocianinas), además que estas matrices vegetales son ricas en compuestos fenólicos los cuales pueden funcionar como copigmentadores naturales.

Existe evidencia que las condiciones de extracción sólido-líquido afectan el rendimiento y estabilidad de los pigmentos extraídos. Además, los procesos de extracción asistidos por ultrasonido pueden incrementar la eficiencia de extracción de antocianinas de Jamaica, sin embargo, se tiene poca información sobre la estabilidad de dichos compuestos. Por otro lado, se ha reportado que la estabilidad de las antocianinas se puede incrementar mediante el fenómeno de copigmentación. Estos copigmentadores pueden extraerse de manera diferencial con diferentes solventes o pueden ser adicionados, se ha utilizado algunos ácidos fenólicos como el ácido clorogénico, el cual mejora la estabilidad de la antocianina mayoritaria, sin embargo, el costo de este ácido es muy alto, por lo que resulta un compuesto económicamente no viable.

Por lo tanto, en este proyecto el objetivo fue identificar las mejores condiciones de extracción de pigmentos de Jamaica y la adición copigmentadores para mejorar la estabilidad térmica de estos compuestos. Para ello se emplearon tecnologías emergentes como ultrasonido, y se emplearon copigmentadores para aumentar la estabilidad de dichos pigmentos evaluándolos en un modelo de bebidas.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo General

Extraer pigmentos estables de cálices de Jamaica combinando un sistema sólido-líquido en medio ácido con una extracción asistida por ultrasonido y evaluar el efecto de copigmentadores sobre la estabilidad de dichos pigmentos.

4.2 Objetivos específicos

- 1) Identificar condiciones de extracción sólido-líquido (ESL) que genere altos rendimientos y estabilidad de los pigmentos rojos de Jamaica.
- 2) Identificar los compuestos fenólicos asociados a la estabilidad de los pigmentos de Jamaica
- 3) Evaluar el efecto combinado de la extracción sólido líquido (ESL) y la extracción asistida por ultrasonido (EUA), sobre la eficiencia y estabilidad de pigmentos rojos de Jamaica
- 4) Incrementar la estabilidad térmica de los pigmentos rojos de Jamaica, mediante la adición de copigmentadores y evaluar su estabilidad en una bebida modelo

V. Metodología

5.1 Material Vegetal

Los pigmentos se extrajeron a partir de cálices de Jamaica, variedad “morada jersey puebla” obtenida por el INIFAP, los calices deshidratados, fueron molidos y se homogenizó su tamaño de partícula < 425 μm , pasándolos por un tamiz malla #40, posteriormente la harina de Jamaica se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

5.2 Condiciones de extracción sólido- líquido (ESL) de pigmentos rojos

El diseño y las condiciones de extracción se muestra en el Cuadro 1, donde se aplicó un diseño factorial fraccionado 2^{6-3} , el cual permitió evaluar 6 diferentes factores de extracción en dos niveles, realizando solo 8 tratamientos. Los 6 factores utilizados y sus niveles fueron temperatura (35 y 75 °C), tipo de ácido (acético y cítrico), porcentaje de ácido (0.5 y 2.0), tiempo de extracción (15 y 60 min), proporción sólido:solvente (1:8 y 1:3) y solvente H₂O:Metanol (80:20 y 20:80). Los solventes y ácidos que fueron elegidos son permitidos por el codex “norma general para los aditivos alimentarios” permitiendo generar pigmentos libres de solventes y ácidos no permitidos en alimentos.

Cuadro 1. Condiciones de extracción sólido-líquido (ESL) empleadas para obtener pigmentos de Jamaica

tratamiento	Temperatura (°C)	Tipo Ácido	Porcentaje ácido	Tiempo de extracción (min)	Proporción sólido: solvente	Solvente H ₂ O:Metanol
ESL 1	35	Acético	0.5	15	1:8	80:20
ESL 2	75	Cítrico	2.0	15	1:8	80:20
ESL 3	35	Cítrico	0.5	60	1:8	20:80
ESL 4	75	Acético	0.5	60	1:3	80:20
ESL 5	75	Cítrico	0.5	15	1:3	20:80
ESL 6	35	Cítrico	2.0	60	1:3	80:20
ESL 7	75	Acético	2.0	60	1:8	20:80
ESL 8	35	Acético	2.0	15	1:3	20:80

EL diagrama general para el proceso de extracción se muestra en la Figura 5. Para realizar la extracción, se colocó la Jamaica molida en tubos para centrifuga de 15 mL, posteriormente se adicionó el solvente y el ácido de acuerdo al tratamiento

como se especifica en el cuadro 1. Las muestras posteriormente se homogenizaron en un vórtex durante 15 segundos y se colocaron en un termobañó a una agitación de 120 RPM, a la temperatura y tiempos especificados en el tratamiento de acuerdo al cuadro 1, al finalizar el tiempo de extracción se centrifugaron a 22400 g, por 5 minutos y posteriormente se recuperó el sobrenadante.

Al finalizar el proceso de extracción se determinó la eficiencia de extracción de todos los tratamientos de acuerdo al Cuadro 1, utilizando como medida de respuesta el contenido de antocianinas monoméricas totales.

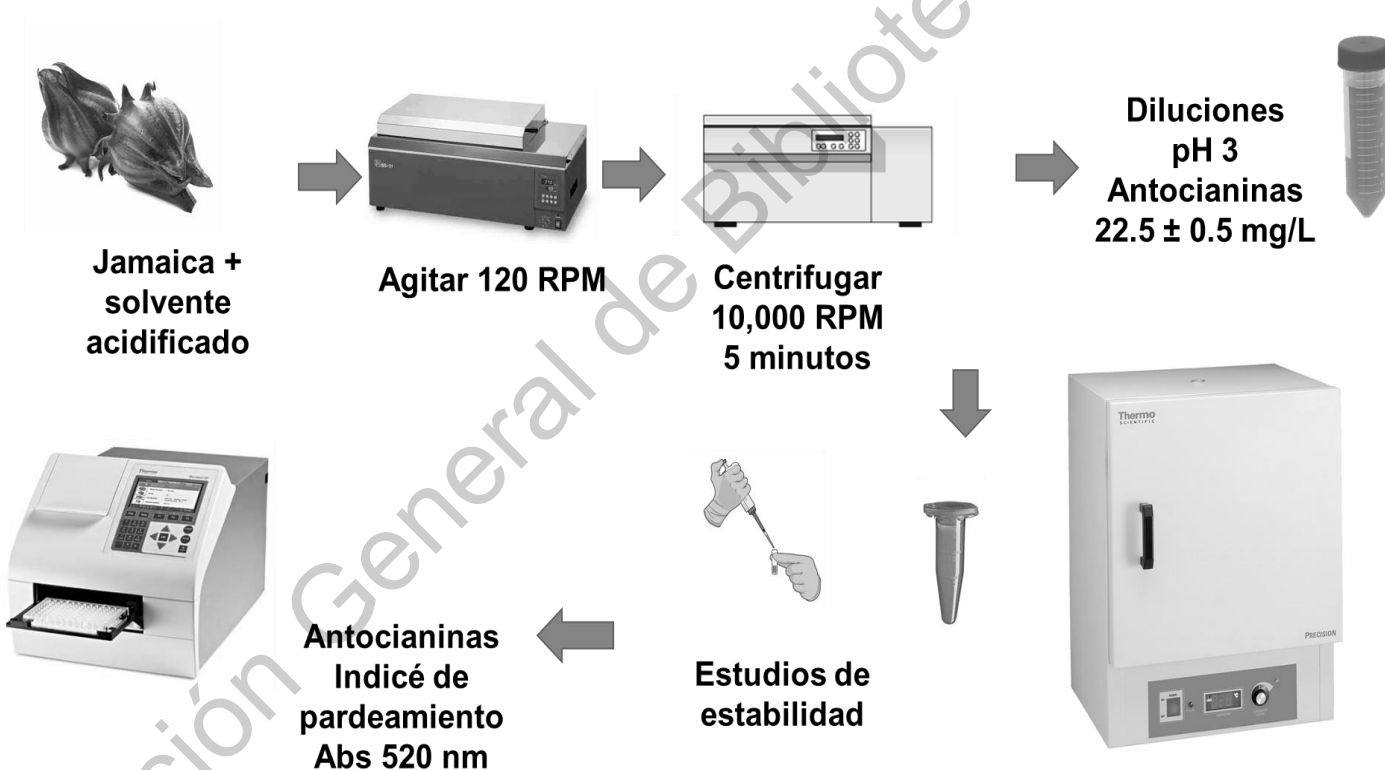


Figura 5. Diagrama de flujo de proceso de extracción y evaluación de la estabilidad térmica de pigmentos de Jamaica.

5.3 Estabilidad térmica y estabilidad al almacenamiento de pigmentos rojos de Jamaica.

Para determinar las condiciones de extracción que permiten obtener pigmentos rojos más estables, se elaboró un modelaje, en el cual los extractos obtenidos mediante los procesos de ESL fueron diluidos a concentraciones de antocianinas de 22.5 mg/mL en soluciones amortiguadoras a pH 3 que se elaboraron a partir de una solución 0.025 M de cloruro de potasio. El sistema fue ajustado con HCl concentrado o con NaOH al 10 % antes del ajuste del volumen final.

Para realizar las pruebas de estabilidad 2 mL de cada muestra se colocó en tubos eppendorf cerrados color ámbar y se almacenaron a 4 °C, 25 °C, 35 °C, 45 °C y 80 °C y se monitorearon durante 45 días para las primeras 4 temperaturas y 8 horas para 80 °C. Para las primeras 4 temperaturas se realizaron 7 muestreos durante el tiempo de almacenamiento a los 0, 3, 6, 9, 17, 30 y 45 días, mientras que a 80 °C se muestreo a las 0, 2, 4, 6 y 8 horas, a todas las muestras se le determinaron antocianinas monoméricas e índice de pardeamiento, además se les realizó un análisis colorimétrico durante el tiempo de almacenamiento.

Con el contenido de antocianinas en el tiempo, se elaboró un modelaje de las cinéticas de degradación de antocianinas para todas las temperaturas antes mencionadas, donde la degradación de las antocianinas fue ajustada mediante una regresión lineal y no lineal. Con lo anterior se identificaron parámetros importantes como K, constante de degradación y $T^{(1/2)}$, que es el tiempo que las antocianinas tardan en degradarse a la mitad de su concentración original, valor que fue expresado en días para las primeras 4 temperaturas y en horas para 80 °C. En cuanto a las cinéticas obtenidas mediante ajuste no lineal, se determinó el valor de K (constante de degradación) y d, que corresponde al tiempo en que los datos cambiaron de la primera fase de degradación más rápida, a una fase de degradación más lenta, lo cual también es un indicio de la estabilidad de los pigmentos.

Además, a los extractos, se les identificó y cuantificó su contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, mediante cuantificaciones totales y por UPLC-PDA, para tratar de atribuir la mayor estabilidad a algún grupo de compuestos fenólicos que actúen como copigmentadores.

5.3.1. Cuantificación de antocianinas monoméricas

El contenido de antocianinas totales de los pigmentos rojos se realizó con el método diferencial de pH descrito por Lee *et al.*, (2005) con algunas modificaciones, se prepararon dos diluciones de los extractos, una en una solución amortiguadora de cloruro de potasio (0.25 M pH 1) y otra en una solución de acetato de sodio (0.4 M pH 4.5) donde se colocaron 50 μ l y 175 μ l de solución de cloruro de potasio y acetato de sodio, y se realizaron las mediciones de absorbancia a 510 y 700 nm en un lector ELISA marca thermo scientific, los resultados se expresaron como mg eq Cianidina 3-O-Sambubiósido y los resultados se obtuvieron con la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas monoméricas totales} = (\text{abs total}) (\text{PM}) (\text{FD}) (\epsilon)$$

$$\text{Abs totales} = [(\text{abs } 510\text{nm} - \text{abs } 700\text{nm}) \text{ pH } 1 - (\text{abs } 510\text{nm} - \text{abs } 700\text{nm}) \text{ pH } 4.5$$

$$\text{PM} = \text{Peso molecular de la antocianina mayoritaria}$$

$$\text{FD} = \text{Factor de dilución}$$

$$\epsilon = \text{Coeficiente de extinción molar de la antocianina mayoritaria}$$

5.3.2 Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se realizó siguiendo la metodología de Singlenton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico, posteriormente se agregaron 10 μ l del extracto, 65 μ l de agua destilada y 37.5 μ l de reactivo folín 1N, se agitaron y dejaron reaccionar durante 5 min, posteriormente se les agregó 187.5 μ l de una solución de carbonato de sodio al 20% y se dejó reaccionar durante 20 minutos protegido de la luz, para finalmente medir la absorbancia a 765 nm con un lector ELISA marca thermo scientific, los resultados se expresaron como mg ácido gálico/100 g de muestra seca.

5.3.3 Cuantificación de flavonoides

Se utilizó la metodología de Robertson y Hall (1989) con modificaciones. Se realizó una curva de calibración con catequina. Posteriormente se adicionó 20 μ l de pigmento, 105 μ l de agua destilada y 7.5 μ l de nitrito de sodio al 5% y se dejó

reaccionar por 6 minutos, luego se le agregó 15 µl de cloruro de aluminio al 10% y se dejó reaccionar 5 minutos, para finalizar se le agregó 50 µl de hidróxido de sodio 1 N y 52.5 µl de agua destilada. Se leyó a absorbancias de 510 nm en un lector ELISA marca thermo scientific, los resultados se expresaron como mg de catequina/100 g de muestra seca.

5.3.4 Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides en pigmentos de Jamaica por UPLC-PDA

Para la cuantificación de los diferentes compuestos, 1 µl de muestra fue inyectada a un sistema (ACQUITY UPLC), equipado con un Auto-Sampler (Waters ACQUITY FTN) y un detector (Waters Acquity PDA) con lectura desde los 250 nm hasta 560 nm. Se usó como fase móvil (A) agua 7.5mM ácido fórmico, y fase móvil (B) acetonitrilo. Los gradientes de inyección fueron los siguientes en la proporción (A/B). (97/3) en el minuto 0, (91/9) en el minuto 1.23, (84/16) en el minuto 3.82, (50/50) en el minuto 11.40, (97/3) en el minuto 13.34 y (97/3) en el minuto 15.00, con un tiempo de corrida de 16.00 min por cada inyección.

Posteriormente con los datos que se obtuvieron en el perfil de compuestos fenólicos y flavonoides se realizó un análisis de componentes principales, para identificar si el perfil tiene alguna relación con los sistemas de extracción y la estabilidad de los mismos.

5.4. Mediciones de color e índice de pardeamiento

5.4.1 Medición de color

El análisis de color se llevó a cabo en un lector de microplacas marca thermo scientific, donde 300 µl de los pigmentos se colocaron en una microplaca de 96 pozos. Los datos colorimétricos expresados en el sistema de comunicación CIELAB fueron calculados de los datos de absorbancia espectral (380-780 nm, con intervalos de 1 nm) usando las ecuaciones estándar CIE, la distribución espectral iluminante D65, y las funciones del observador ángulo 10°, los datos fueron capturados en el software colorbyspectra

Los parámetros CIE calculados fueron L^* (que correlaciona con luminosidad, en un rango de 0, negro a 100, blanco), y dos coordenadas de color, a^* (que los valores positivos correlacionan con colores rojos, y valores negativos para verdes) b^* (positivo para valores amarillos, y negativos para azulados). De estas coordenadas otras propiedades de color fueron definidas: el ángulo hue (h_{ab} , que correlaciona con la tonalidad) y croma (C^*_{ab} que correlaciona con la viveza del color) (Gordillo *et al.*, 2018; Sigurdson *et al.*, 2018).

5.4.2 Índice de pardeamiento

El índice de pardeamiento se determinó para monitorear el cambio de una coloración roja (característica de la estructura de la antocianina en el catión flavilio con una coloración roja a un pico máximo de absorbancia a 520 nm) hasta la estructura de las chalconas las cuales pierden su coloración debido al rompimiento de enlaces en el anillo C de las antocianinas (con una coloración café y un pico en la absorbancia a 430 nm). El cálculo de índice de pardeamiento se realizó colocando 300 μ l de las muestras a analizar en una placa de 96 pozos para medir las absorbancias a 430 y 520 nm en un lector ELISA marca thermo scientific, el cálculo se realizó con el coeficiente de $\text{abs } 430 \text{ nm} / \text{abs } 520 \text{ nm}$.

5.5 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

Se seleccionó la condición del sistema de ESL que mejore de manera considerable la estabilidad de los pigmentos de Jamaica, para aplicarlos en un sistema de extracción asistida por ultrasonido. Lo anterior con la intención de incrementar la eficiencia de extracción de los pigmentos y monitorear si tiene algún impacto la EAU en la estabilidad de los pigmentos de Jamaica.

Para lo anterior se realizó el procedimiento que se describe en la Figura 6, donde se peso Jamaica molida en un tubo para centrifuga de 15 mL, posteriormente se adicionó el solvente acidificado que genero mejores propiedades de estabilidad en los sistemas de ESL. La extracción se realizó en un ultrasonido tipo baño marca Cole-Parmer, donde se evaluó dos frecuencias (28 KHz y 40 KHz), además para

determinar si el tiempo de extracción era un factor importante en la eficiencia de extracción de antocianinas y la estabilidad de los compuestos se decidió realizar extracciones a diferentes tiempos, tal y como se muestra en el Cuadro 2. Por último, también se replicaron las condiciones de tiempo en un sistema ESL para poder comparar los dos sistemas de extracción.

Cuadro 2. Condiciones de extracción evaluadas para EAU

ESL		Tiempo de extracción
EAU	28 KHz	3 min
	40 KHz	5 min
		7 min
		10 min
		20 min
		30 min
		60 min

Después de realizar la extracción descrita anteriormente se procedió como se describe en la Figura 6, se centrifugaron los pigmentos a 22400 g, durante 5 minutos, posteriormente el sobrenadante se ajustó a una concentración de antocianinas de 22.5 mg/L medido a través del método de pH diferencial y se ajustó el pH a 3 en una solución amortiguadora de acetato de sodio y se colocaron en tubos color ámbar y fueron sometidos a un tratamiento térmico de 80 °C por 5 horas con nuestra cada hora. Determinando la degradación de antocianinas totales monoméricas e índice de pardeamiento.

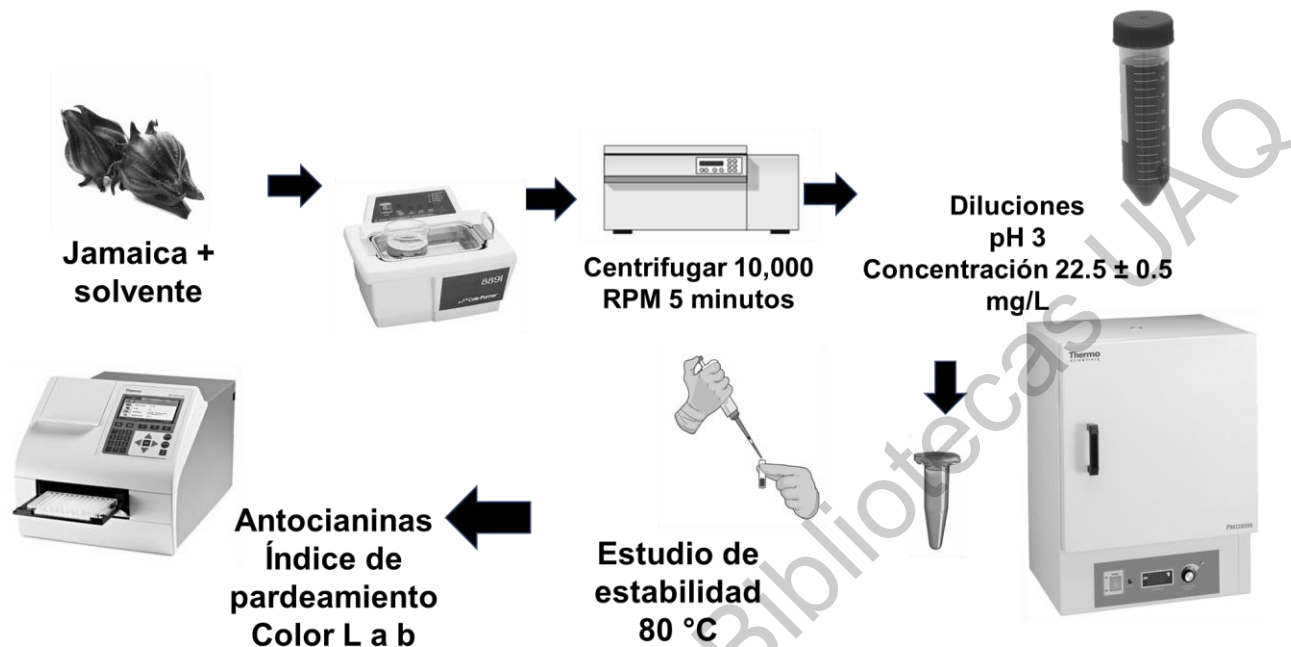


Figura 6. Metodología para la extracción asistida por ultrasonido

5.6 Adición de copigmentadores para aumentar la estabilidad de los pigmentos rojos de Jamaica

Al tratamiento del sistema de ESL que mostró mejores propiedades de estabilidad fue seleccionado para evaluar su comportamiento y degradación a condiciones de almacenamiento a altas temperaturas (80 °C) durante 8 horas.

Al extracto con mejores propiedades de estabilidad, se ajustó su concentración de antocianinas (22.5 mg/mL) y el pH a 3. Posteriormente se realizó una prueba para determinar los copigmentadores que mostraban un mayor efecto estabilizante sobre los pigmentos de Jamaica, ya que esta matriz vegetal es rica en antocianinas no aciladas lo cual dificulta el fenómeno de la copigmentación, para la prueba mencionada anteriormente al pigmento se adicionó una concentración de 1% de los siguientes copigmentadores; polisacáridos como goma guar, goma garrofin, inulina,

carboximetilcelulosa (CMC) y goma xantana. Se adicionó proteína concentrada de suero de leche (WPC) y los hidrolizados de suero de leche biozate 3 y biozate 7, además de la proteína α -lactoglobulina. También se adicionó un extracto de garcinia cambogia, y como compuesto fenólico el ácido gálico. Lo anterior tratando de incluir a los grupos de compuestos que tienen reportado un efecto potencialmente copigmentador y estabilizante de antocianinas.

5.7. Efecto en la estabilidad en pigmentos de Jamaica por la adición de un copigmentador en diferentes concentraciones y medición del efecto hiperocrómico y batocrómico

Como se mencionó en el párrafo anterior los sistemas pigmento:copigmento fueron sometidos a 80 °C durante 8 horas monitoreándose su degradación a través del índice de pardeamiento. De este experimento fue seleccionado el copigmento con mayor capacidad de mejorar la estabilidad de los pigmentos de Jamaica. Con el copigmento seleccionado se realizaron pruebas de estabilidad a 80 °C durante 8 horas a diferentes concentraciones de copigmento (0.5, 1 y 1.5 %) donde se midió el índice de pardeamiento, la absorbancia a 520 nm, representando el color rojo, además se evaluó el efecto hiperocrómico y batocrómico haciendo un análisis espectrofotométrico, al colocar 300 μ l de los sistemas pigmento:copigmento en una microplaca de 96 pozos para medir la absorbancia de 350 a 820 nm con un intervalo de 1 nm, midiendo el efecto de la adición del copigmento a los pigmentos de Jamaica en el incremento de la absorbancia máxima (efecto hiperocrómico) y el movimiento de la longitud de onda donde se encuentra la absorbancia máxima (efecto batocrómico).

5.8 Evaluación de los sistemas pigmento:copigmento en un modelo de bebidas

El modelo de bebidas se utilizó para determinar la estabilidad de los pigmentos que mostraron una mayor estabilidad (con y sin copigmentadores). El modelo consistió en una solución con un 0.5, 1 y 1.5 % de copigmentador, con una solución a una concentración de 22.5 mg/L de antocianinas de pigmentos obtenidos mediante ESL, además de 0,05% de ácido ascórbico y 0,01% de iones de calcio. El pH de los

sistemas mixtos se ajustaron a pH 3,0 para posteriormente ser almacenadas durante 3 días a 40 °C (Chung *et al.*, 2016), posteriormente se determinó la degradación de anocianinas y el incremento del índice de pardeamiento.

5.9 Análisis estadístico

Los resultados se reportaron como la media \pm desviación estándar, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el perfil de compuestos fenólicos y flavonoides. Los modelos matemáticos de las cinéticas de degradación se procesaron Microsoft Excel 2016. La comparación entre todos los tratamientos se realizará con la prueba de Tukey. Los datos se analizaron con el paquete estadístico utilizando el software R 3.4.3

VI. Resultados y discusiones

6.1 Eficiencia de extracción de antocianinas totales monoméricas, por sistemas de ESL

La extracción sólido-líquido (ESL) es un método clásico para recuperar antocianinas de tejidos vegetales, generalmente usándose solventes polares acidificados, ya que estos permiten una mejor difusión de las antocianinas (Silva *et al.*, 2015; Barnes *et al.*, 2009). Se han reportado varios parámetros que afectan la eficiencia de extracción de antocianinas, siendo los más comunes el solvente y la temperatura, así como, tiempo de extracción y relación sólido: solvente (Silva *et al.*, 2015). Por lo que existe una necesidad de ajustar los protocolos de extracción de antocianinas a cada tejido vegetal.

Para evaluar el efecto que tienen los diferentes tratamientos sobre la eficiencia de extracción de pigmentos de Jamaica, se determinó la concentración de antocianinas totales monoméricas (ATM). En el Cuadro 3 se observa que existe una diferencia del 38 % entre los tratamientos con menor y mayor extracción. Los tratamientos ESL2 y ESL7 fueron los que mostraron la mayor eficiencia de extracción (1772 a 1764 mg/100 g), mientras que los tratamientos ESL5 y ESL8 presentaron los valores más bajos de extracción (1108 a 1151 mg/100 g). Resultados similares han sido reportados por Barnes *et al.*, (2009) donde se usaron diferentes solventes y ácidos para realizar la extracción de antocianinas de arándanos, encontrándose que diferentes solventes acidificados lograban una diferencia en la eficiencia de extracción, siendo el mejor solvente el etanol acidificado con ácido tricloroacético.

El rango de eficiencia de extracción de antocianinas fue de 1.1-1.7 g/100 g de peso seco, resultados que concuerdan con Du & Francis (1973), quienes reportaron una extracción de antocianinas de Jamaica de 1.5 g/100 g de peso seco. Mientras que Khafaga *et al.*, (1980), reportaron una eficiencia de extracción de 1.7-2.5 g/100 g de peso seco.

Cuadro 3. Rendimiento de extracción de antocianinas totales monoméricas (ATM)

Tratamiento	ATM
ESL1	1523.3 ± 152.5 ^{ab}
ESL2	1772.1 ± 88.6 ^a
ESL3	1473.2 ± 64.0 ^b
ESL4	1464.1 ± 48.1 ^b
ESL5	1151.6 ± 173.7 ^c
ESL6	1514.1 ± 159.6 ^{ab}
ESL7	1764.2 ± 151.1 ^a
ESL8	1102.7 ± 70.6 ^c

Los datos corresponden a 3 repeticiones ± desviación estándar. Las letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) por la prueba de tukey. Los datos son expresados por cada 100 g de materia seca. ATM reportadas como equivalentes de cianidina 3-O-Sambubiosido.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para determinar el impacto que tienen los factores (temperatura, tipo de ácido, porcentaje de ácido, tiempo de extracción, sólido:solvente y solvente) sobre la eficiencia de extracción, y aquellos que tuvieron un mayor efecto, por orden de importancia, fueron: sólido:solvente, solvente, tiempo de extracción y tipo de ácido (Cuadro 4).

Las regiones experimentales de los factores que permiten aumentar la eficiencia de extracción, se presentan en la Figura 7, en la que se muestran los 4 factores que tuvieron más relevancia en la eficiencia de extracción en sus dos respectivos niveles. En cuanto a la proporción sólido: solvente, la mayor eficiencia de extracción se obtuvo usando la relación 1:8 (Jamaica:solvente). En cuanto a la relación de

solido: solvente, lo más importante que se debe tener en cuenta es la solubilidad de los compuestos a extraer (Rostagno & Prado, 2013).

Cuadro 4. Análisis de factores que intervienen en la eficiencia de extracción de antocianinas.

Factor	Df	Suma de cuadrados	Valor F	P (>F)
Temperatura	1	10147	13.243	0.001018
Tipo de ácido	1	88	0.115	0.737170
Porcentaje de ácido	1	10893	14.216	0.000715
Tiempo de extracción	1	15333	20.011	0.000103
Solido: Solvente	1	49190	64.198	6.07 E-09
Solvente	1	17088	22.302	5.09 E-05
Residuales	30	22987		

En cuanto al solvente se obtuvo una mayor eficiencia de extracción usando un solvente con 80% agua y 20% etanol. La relación agua: disolvente también es una variable interesante a tener en cuenta, ya que varía con el disolvente y la composición del tejido de extracción. En uvas Cabernet, la disminución de la proporción acetona/agua lleva a rendimientos más bajos de antocianinas, mientras que hacer lo mismo con etanol tuvo el efecto opuesto. Por otro lado, para las uvas merlot no hubo una relación aparente entre la relación agua: solvente y la eficiencia de extracción (Vatai *et al.*, 2009). En contraste, Yang *et al.*, (2012) encontraron resultados similares ya que compararon extracciones de antocianinas de Jamaica con solventes con diferente concentración de etanol, encontrando que una concentración usando un solvente con un 30 % de etanol podía recuperar aproximadamente un 40 % más antocianinas que usando un solvente con 95 % de etanol.

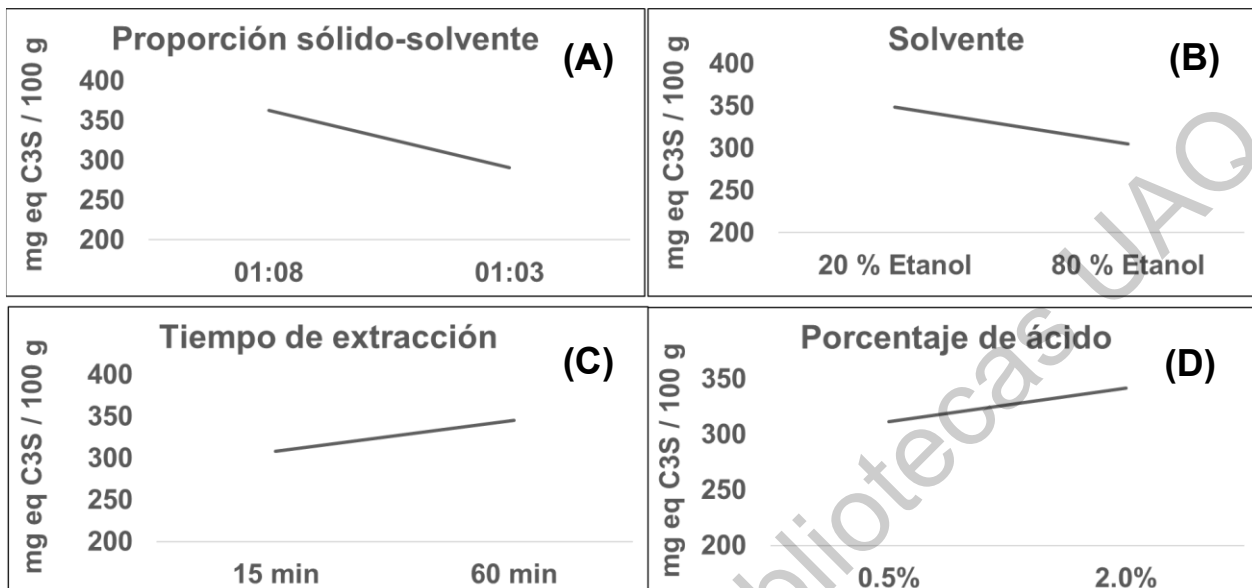


Figura 7. Factores que influyen en el rendimiento de extracción de antocianinas de Jamaica. Proporción sólido solvente (A). Solvente (B). Tiempo de extracción (C). Porcentaje de ácido (D). C3S: Cianidina 3-O-Sambubiosido.

En cuanto al tiempo de extracción, este tiende a variar de acuerdo con otras condiciones de extracción, como las características del solvente y la temperatura de extracción (Cacace & Maza 2003). De acuerdo a la Figura 7C mayores eficiencias se lograron en tiempos de extracción de 60 minutos comparado con 15 min.

En cuanto al porcentaje de ácido, mayores eficiencias de extracción se obtuvieron usando un porcentaje de ácido mayor (2%) (Figura 7D). Lo cual no coincide con el trabajo de Barnes *et al.*, (2009), quienes reportaron que la concentración de ácido no afecta la eficiencia de extracción de antocianinas de arandano.

6.2 Degradación de pigmentos de Jamaica obtenidos por sistemas de ESL sometidos a diferentes temperaturas

6.2.1. Contenido de antocianinas

En la mayoría de los trabajos realizados hasta el momento el principal interés es buscar las mejores condiciones que permitan obtener una mayor eficiencia de extracción, sin embargo, también se requiere buscar las condiciones óptimas de mayor estabilidad de dichos pigmentos, ya que las antocianinas son compuestos sensibles a cambios en la temperatura, pH, luz, oxígeno y metales (gordillo *et al.*,

2018). Por otro lado, la estabilización de antocianinas sigue siendo un importante desafío para la industria de los colorantes de alimentos (Cortez *et al.*, 2017).

Se evaluó la estabilidad de todos los tratamientos, ya que se esperaba que diferentes métodos de extracción, podrían extraer pigmentos con diferentes concentraciones de antocianinas y diferentes concentraciones de compuestos que puedan afectar la estabilidad térmica de las antocianinas por el fenómeno de la copigmentación.

Para evaluar la estabilidad de los pigmentos de Jamaica, los pigmentos se ajustaron a una concentración de 22.5 mg/L de antocianinas y a pH 3, posteriormente las muestras se colocaron en tubos plásticos de color ámbar y se sometieron a diferentes temperaturas.

Cuando los pigmentos fueron almacenados a 4 °C (Figura 8 A), el tratamiento que mostro una menor pérdida de antocianinas fue ESL3, con 8.9 %, seguidos en orden por ESL7, ESL8 y ESL5 con 14.2, 14. 7 y 19.3 %, mientras que los tratamientos que mostraron una mayor degradación fueron ESL1, ESL6, ESL4 y ESL2 con 23.1, 33.1, 36.5 y 36.8 % de degradación de antocianinas respectivamente después de ser almacenados a 4 °C durante 45 días.

Los resultados anteriores son similares a los reportados por Sinela *et al.* (2017), quienes reportaron una degradación de las antocianinas mayoritarias de Jamaica Delfinidina 3-O-sambubiósido y Cianidina 3-O-sambubiósido de 11 y 17 % respectivamente, al ser almacenadas durante 60 días a 4 °C, este incremento en la estabilidad de este estudio se puede atribuir al pH de sus pigmentos que fue 2.2, un pH menor al empleado en este trabajo (pH 3) lo cual contribuye a que las antocianinas se encuentren en su forma de catión flavilio, siendo una estructura más estable (Trouillas *et al.*, 2016). Las tasas de degradación más bajas observadas fueron a 4 °C, resultados consistentes con Zozio *et al.* (2011).

Los resultados de la degradación de antocianinas de los diferentes tratamientos a 25 °C se presentan en la Figura 8 B, donde los tratamientos que mostraron un mayor contenido de antocianinas residuales después de 45 días fueron ESL3, ESL5, ESL8

y ESL7 con una degradación del 44, 46, 41 y 42 % respectivamente, en contraste los pigmentos que mostraron una mayor degradación fueron ES1, ESL2, ESL4 y ESL6 con una pérdida del 55, 67, 70 y 79 % respectivamente. Es de recalcar que el tratamiento ESL3 mostro 193.02 % más antocianinas residuales después de ser almacenados a 25 °C durante 45 días que el tratamiento ESL6, haciendo evidente el impacto que tienen los factores de extracción en la estabilidad de los pigmentos de Jamaica.

Los resultados anteriores son similares a los reportados por Luna-Vital *et al.* (2018), quienes reportan una degradación del 83% de la antocianina Cianidina 3-O-Glucósido obtenida de maíz morado, después de ser almacenadas a 25 °C durante 84 días, mientras que en nuestro estudio el promedio de degradación entre todos los tratamientos fue de 55 % después de ser almacenados a 25 °C durante 45 días.

El resultado de almacenar los diferentes pigmentos de Jamaica a 35 °C durante 45 días se muestra en la Figura 8 C, donde se observan dos tendencias claras, la primera los pigmentos que tienden a degradarse de manera más rápida, los cuales son los extraídos con 20 % de etanol, mientras el segundo grupo que muestra una mayor estabilidad esta conformado por los pigmentos que fueron extraídos con 80 % de etanol. Es de recalcar que nuevamente el tratamiento que mostró una mayor estabilidad fue ESL3 el cual perdió aproximadamente el 67 % de sus antocianinas iniciales después de 45 días, mientras que el tratamiento que se comportó más inestable fue ESL6 el cual perdió aproximadamente el 89 % de sus antocianinas después de 45 días.

El resultado anterior es consistente a los reportado por Muche *et al.* (2018), quienes reportan una perdida de aproximadamente el 85% de las antocianinas totales de jugo de dos diferente variedades de uva almacenados a 35 °C durante 60 días, y con lo reportado por Sinela *et al.* (2017) que reportaron pérdidas de aproximadamente el 95 % de antocianinas después de ser almacenadas 40 días a 37 °C.

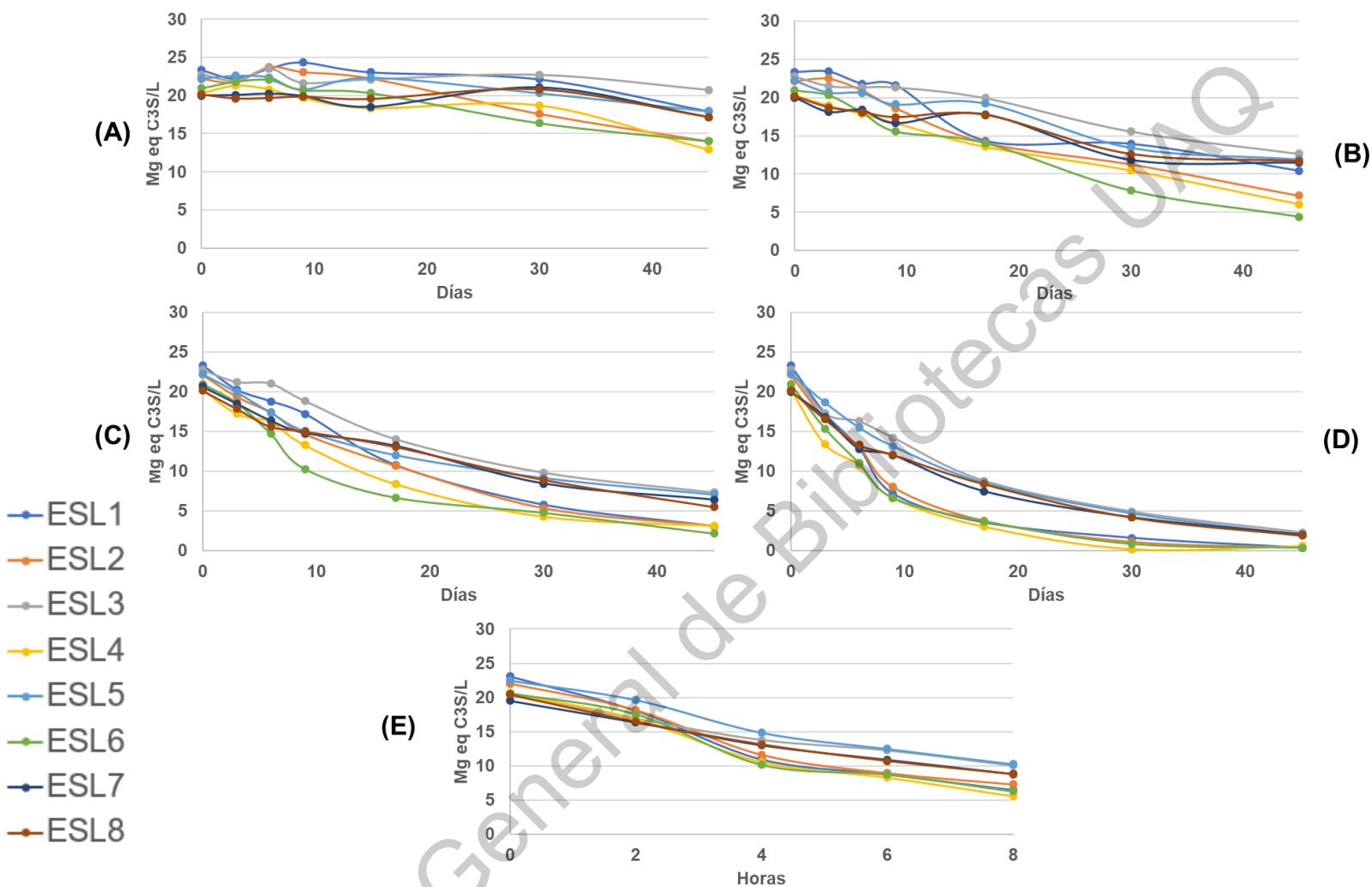


Figura 8. Degradación de antocianinas de pigmentos de Jamaica almacenados a 4, 25, 35 y 45 °C durante 45 días y a 80 °C durante 8 horas. 4 °C (A), 25 °C (B), 35 °C (C), 45 °C (D) y 80 °C (E).

En cuanto a la degradación de antocianinas de pigmentos de Jamaica cuando fueron almacenados a 45 °C (Figura 8 D) se pueden apreciar los agrupamientos típicos en el comportamiento de degradación ya descrito anteriormente. Nuevamente los tratamientos que tuvieron una menor pérdida de antocianinas después de 45 días a 45 °C fueron ESL3, ESL7, ESL5 y ESL8 con aproximadamente el 90 % de degradación. Mientras que los pigmentos con mayor degradación fueron ESL4, ESL2, ESL6 y ESL1, con una pérdida del contenido de

antocianinas del 100 %, por otro lado, el tratamiento ESL3 mantuvo 5 veces más antocianinas residuales que el tratamiento ESL1.

En cuanto a los pigmentos almacenados a 80 °C durante 8 horas se pueden apreciar resultados similares donde se presentaron tendencias similares a todas las temperaturas de almacenamiento anteriormente mencionadas. La concentración de antocianinas disminuyó con el tiempo en todas las temperaturas, siendo evidente una pérdida más rápida a mayores temperaturas, indicando la degradación de los pigmentos (Sinela *et al.*, 2017).

6.2.2. Índice de pardeamiento de pigmentos

EL procesamiento térmico es extremadamente común y efectivo para preservar alimentos y bebidas, sin embargo dicho proceso puede resultar en pérdidas de estabilidad y degradación en las antocianinas, resultando en un pardeamiento (pérdida de color rojo para tornar a un color café) (Sinela *et al.*, 2017).

Altos índices de pardeamiento, indican degradación de antocianinas, las antocianinas se pueden encontrar en la forma del catión flavilio con una coloración roja, sin embargo, en el almacenamiento pueden ser degradadas a la forma incolora pseudo base carbinol, la cual puede degradarse abriendo su anillo C, generando una estructura chalcona de color café (Pérez-Ramírez *et al.*, 2014; Hubbermann *et al.*, 2006).

En la Figura 9 se presentan los resultados de los pigmentos de Jamaica obtenidos por los diferentes sistemas de extracción, los cuales fueron almacenados a (4, 25, 35 y 45 °C) durante 45 días. Además de ser almacenados durante 8 horas a 80 °C (Figura 9 F). Es de notar que el índice de pardeamiento se incrementó de manera considerable con la temperatura de almacenamiento, tal y como lo reporta Sinela *et al.* (2017). El promedio de este índice, en todos los tratamientos cuando se almacenaron a 4 °C, fue de 0.69 después de ser almacenados durante 45 días, mientras que a 45 °C, el incremento fue hasta de 1.09. Mayores índices de pardeamiento van acompañados de pérdida de antocianinas (Cisse *et al.*, 2012).

En cuanto las muestras almacenadas a 4 °C (Figura 9A), después de 45 días, el tratamiento que mostro un menor índice de pardeamiento fue ESL3, con 0.46, a 25

°C los diferentes tratamientos tienen una tendencia similar en la degradación, no alcanzándose a separarse grupos con un comportamiento de degradación particular, (Figura 9B) a 35 °C y 45 °C ESL3, ESL5 ESL7 y ESL8 mostraron un menor índice de pardeamiento (Figura 9C y 9D) y a 80 °C se observaron la misma tendencia (Figura 9E). Esta última condición es importante ya que este representa condiciones de degradación aceleradas, donde los diferentes pigmentos se almacenaron a 80 °C durante 8 horas y dicha temperatura es usada en la pasteurización (Guang y Zhong, 2015).

En general las muestras que presentaron mayor índice de pardeamiento fueron ESL1, ESL2 , ESL4 y ESL6. Es importante resaltar que los tratamientos que mostraron un menor índice de pardeamiento son consistentes con lo reportado en la degradación de antocianinas (Figura 8). Por otro lado, cuando los tratamientos fueron almacenados a 35 °C se empiezan a distinguir claramente 2 tendencias. Los pigmentos que mostraron una mayor degradación fueron los tratamientos extraídos con menores concentraciones de etanol (20%), mientras que se agruparon con un menor índice de pardeamiento los tratamientos extraídos con 80% de etanol.

El índice de pardeamiento incrementa de manera rápida conforme se incrementa la temperatura de almacenamiento, la degradación térmica de las antocianinas de Jamaica ocasiona la pérdida del color rojo y la subsecuente formación de una coloración café (Sinela *et al.*, 2017; Cisse *et al.*, 2012)

De lo anterior concluimos que los diferentes métodos de extracción de pigmentos de Jamaica, tienen efecto de importancia en la estabilidad de los mismos, siendo un factor de relevancia al generar protocolos de extracción de pigmentos vegetales. Tal y como lo comprueban Cisse *et al.*, (2012) quienes encontraron que las condiciones de extracción, especialmente la temperatura, afectan en gran medida la estabilidad de los extractos durante el almacenamiento.

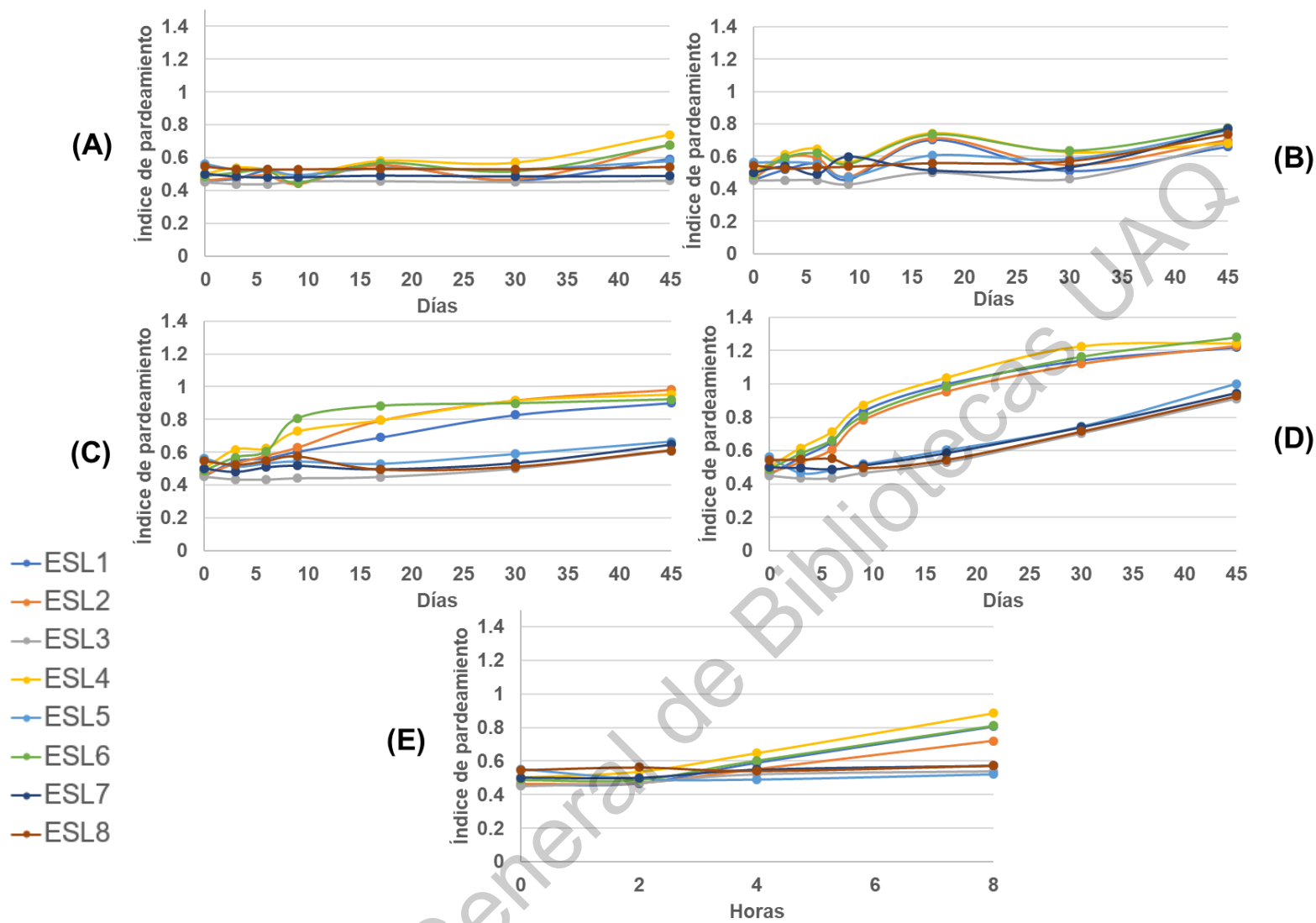


Figura 9: Índice de pardeamiento de pigmentos de Jamaica almacenados a (4, 25, 35 y 45 °C) durante 45 días y a (80 °C) durante 8 horas. 4 °C (A), 25 °C (B), 35 °C (C) 45 °C (D) y 80 °C (E).

6.3 Parámetros de color CIELAB de pigmentos de de Jamaica almacenados a diferentes temperaturas

En la Figura 10, se presentan los colores resultantes después de almacenar todos los pigmentos obtenidos durante 45 días a 4, 25, 35 y 45 °C, donde se puede apreciar que la degradación y la pérdida de coloración roja se incrementa de manera considerable con el aumento de la temperatura de almacenamiento, por otro lado, se puede apreciar que conforme se incrementaron los días de almacenamiento,

todos los tratamientos perdieron su coloración original, donde se observó una pérdida importante del valor a^* y un incremento en la luminosidad L^* , dando como resultado la pérdida de la coloración roja característica para generar una coloración café clara, lo que representa la degradación de la estructura de las antocianinas en chalconas que tienen una coloración café (Sinela *et al.*, 2017).

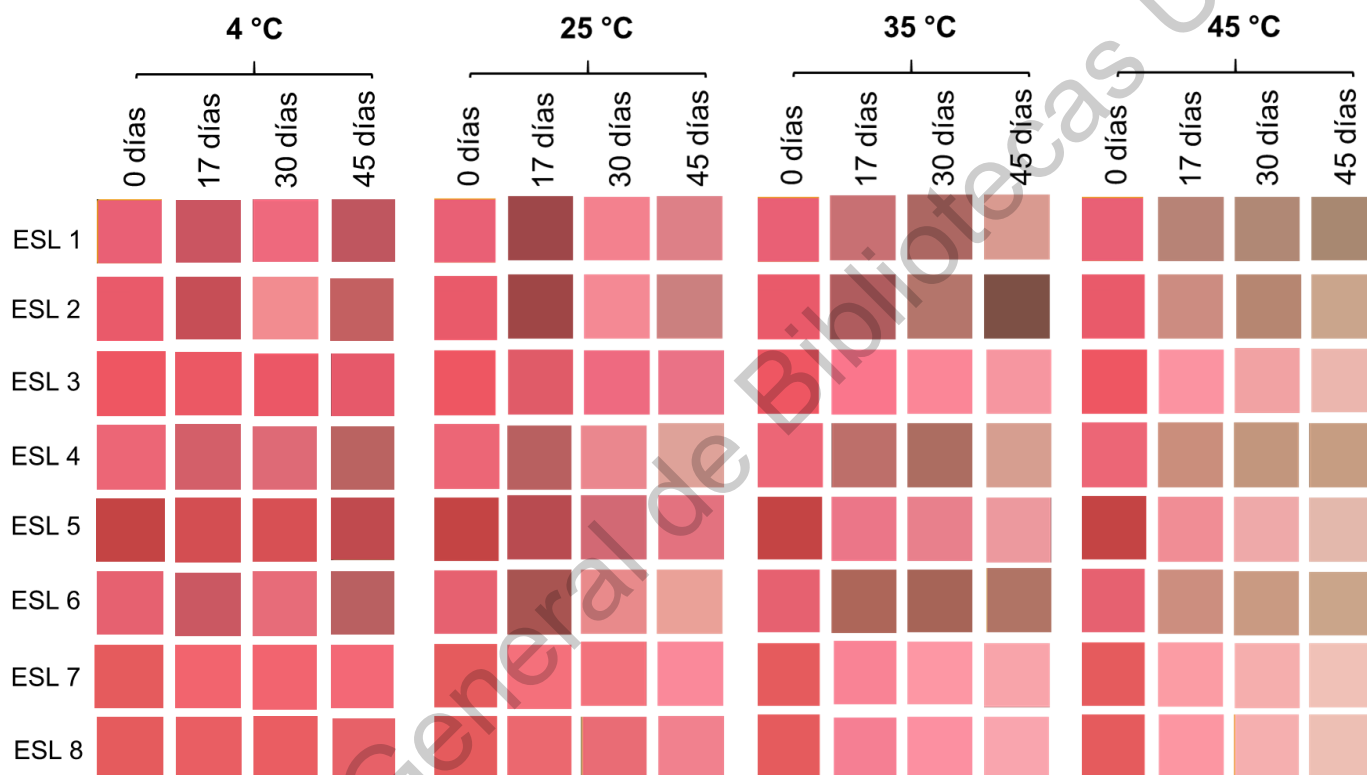


Figura 10. Color de pigmentos de jamaica almacenados a 4 °C, 25 °C, 35 °C y 45 °C, durante 45 días

Por otro lado, los pigmentos ESL3, ESL5, ESL7 y ESL8 fueron los pigmentos con mejor estabilidad retienen el color a 4 y 25 °C, aunque esta estabilidad se vio disminuida a 35 y 45 °C, estos tratamientos retuvieron de manera importante la coloración roja comparado con los tratamientos ESL1, ESL2, ESL4 y ESL6. Lo anterior indica que las condiciones de extracción tienen un efecto crucial tanto en el rendimiento de extracción, como en la estabilidad de los pigmentos, lo cual es indispensable para establecer protocolos exitosos de extracción de colorantes naturales.

6.4 Cinéticas de degradación de contenido de antocianinas modeladas con ecuaciones lineales y no lineales.

Aunque la mayoría de los trabajos que estudian el comportamiento de degradación de antocianinas en el almacenamiento indican que su comportamiento obedece una cinética de primer orden (Gordillo *et al* 2018, Chung *et al* 2017; Chung *et al* 2016, Guang y Zhong 2015), la mayoría de estos trabajos linearizan los datos mediante el empleo de logaritmos, con lo cual se puede perder detalle del comportamiento real de degradación, por lo cual algunos estudios como el de Sinela *et al.*, (2017) modelaron la degradación de antocianinas de jamaica mediante ecuaciones no lineales.

Es por lo anterior que en este trabajo se decidió modelar la degradación de antocianinas totales en el almacenamiento mediante regresión lineal y no lineal, las gráficas donde están modeladas las cinéticas de degradación a 4, 25, 35, 45 y 80 °C, se presentan en el anexo 5, 6, 7, 8 y 9 respectivamente, donde se puede apreciar que conforme se fue incrementando la temperatura de almacenamiento, disminuyó la variación de los datos y se ajustaron los datos a una ecuación no lineal. Los parámetros de degradación de antocianinas de Jamaica almacenadas a 4, 25, 35, 45 y 80 °C se presentan en el Cuadro 5, en cuanto a las cinéticas modeladas mediante una ecuación lineal, se obtuvo el valor de K, que es la constante de degradación y R² que significa el porcentaje de datos que se pueden predecir por la ecuación de la recta. Por otro lado en cuanto a las cinéticas modeladas por ecuaciones no lineales, se calculó K (constante de degradación) y b que es el tiempo en que los datos pasan de una primera etapa de degradación rápida a una segunda etapa de degradación más lenta, lo que indica a un valor más alto a más estabilidad, ya que a mayor valor de b indica una menor degradación.

En cuanto los datos obtenidos de los pigmentos almacenados a 4 °C (Anexo 5) no parece ajustarse los datos a una ecuación en específico, por otro lado en los dos modelamientos aparece nuevamente el ESL3, como la extracción que presenta una menor cinética de degradación con 0.03 y 0.001 modelados con una ecuación lineal y no lineal respectivamente, mientras que el tratamiento que mostro una mayor degradación fue ESL6 con valores de 0.20 y 0.010 lo que significa una diferencia

de hasta 10 veces en la constante de degradación. Por otro lado con los datos obtenidos de almacenar los pigmentos a 25 °C durante 45 días, pareciera que empiezan a tener mejor ajuste con el modelaje realizado con la ecuación no lineal, (Anexo 6), donde los tratamientos que obtuvieron una constante mediante una ecuación no lineal fueron ESL3 y ESL8, con un valor de 0.012, mientras que tuvieron un valor de “d” de 251 y 243 días respectivamente. El pigmento más inestable fue ESL6 con un valor de K de 0.032 y un valor de “d” de 95 días es decir aproximadamente una degradación 2 veces más acelerada comparado con ESL3.

En cuanto a los datos obtenidos a 35 y 45 °C, (Anexo 7 y 8), estos se ajustan bien a la ecuación no lineal, además de observarse una menor variación, resultados similares a los obtenidos por Sinela *et al.* (2017). Por otro lado, los valores de K incrementan conforme incrementa la temperatura de almacenamiento, resultados reportados ampliamente por varios autores (Luna-vital *et al.*, 2018; Sinela *et al.*, 2017; Cortez *et al.*, 2017). El tratamiento que mostró menores valores de k y mayores valores de “d”, modelados con una ecuación no lineal fue ESL3, con 0.027 y 116.7 respectivamente para 35 °C y 0.051 y 59.9 para 45 °C, mientras que el tratamiento que mostro mayor degradación fue ESL6 obteniendo valores de K de 0.062 y 0.112 a 35 °C y 45 °C respectivamente lo que significa una degradación aproximadamente 2 veces mayor comparada con el tratamiento ESL3. Resultados similares se obtuvieron cuando los tratamientos se sometieron a una degradación acelerada a 80 °C, durante 8 horas, donde se observa un claro comportamiento no lineal, donde el tratamiento más estable (ESL3) obtuvo valores de K y “d” de 0.09 y 34 mientras el tratamiento ESL 6 obtuvo valores de 0.20 y 15 respectivamente.

Lo anterior indica que en general los tratamientos al degradarse se comportaron de una manera no lineal, lo que debe considerarse para un correcto modelamiento para obtener información más adecuada de la degradación de pigmentos a diferentes temperaturas de almacenamiento

Cuadro 5. Parámetros de degradación de antocaininas de Jamaica a diferentes temperaturas, modelados por ecuaciones lineales y no lineales

Temperatura	4 °C				25 °C				35 °C				45 °C				80 °C			
	Regresión	Lineal	No lineal		Lineal	No lineal			Lineal	No lineal			Lineal	No lineal			Lineal	No lineal		
Tratamiento	k	R ²	k	d	k	R ²	k	d	k	R ²	k	d	k	R ²	k	d	k	R ²	k	d
ESL1	-0.11	0.49	0.005	675.70	-0.31	0.73	0.026	123.40	-0.46	0.89	0.04	72.30	-0.45	0.69	0.11	28.26	-2.13	0.92	0.17	18.64
ESL2	-0.20	0.43	0.010	321.30	-0.36	0.90	0.026	123.40	-0.42	0.90	0.05	67.66	-0.44	0.75	0.10	30.52	-2.02	0.89	0.15	21.18
ESL3	-0.03	0.07	0.001	2204.00	-0.23	0.81	0.012	251.57	-0.36	0.92	0.03	116.70	-0.42	0.88	0.05	59.97	-1.27	0.91	0.09	34.15
ESL4	-0.16	0.53	0.009	355.40	-0.31	0.86	0.025	123.00	-0.38	0.84	0.05	62.54	-0.38	0.69	0.12	25.74	-1.94	0.93	0.16	19.23
ESL5	-0.07	0.30	0.003	907.70	-0.23	0.87	0.014	221.70	-0.32	0.85	0.03	105.40	-0.43	0.88	0.05	56.54	-1.58	0.85	0.10	29.83
ESL6	-0.18	0.75	0.010	324.20	-0.38	0.79	0.032	95.56	-0.40	0.76	0.06	49.19	-0.40	0.71	0.11	27.12	-1.90	0.91	0.15	20.53
ESL7	-0.05	0.16	0.002	1311.00	-0.19	0.76	0.013	235.20	-0.30	0.92	0.03	113.00	-0.38	0.86	0.06	53.49	-1.35	0.94	0.10	30.04
ESL8	-0.04	0.13	0.002	1467.00	-0.19	0.78	0.012	243.60	-0.30	0.90	0.03	110.10	-0.38	0.88	0.05	55.70	-1.46	0.95	0.11	28.11

Dirección General de Protección y Control Agropecuario

6.5. Concentración de compuestos fenólicos y flavonoides totales

Gordillo *et al.*, (2018) proponen el fenómeno de copigmentación natural como un mecanismo por el cual algunos compuestos de la matriz vegetal rica en antocianinas entre ellos compuestos fenólicos y flavonoides pueden interactuar y estabilizar las antocianinas. Por lo que, una explicación por el cual el solvente utilizado en la extracción de pigmentos de antocianinas, afecto de manera tan clara a la estabilidad de las mismas puede ser que la polaridad del solvente influyó en la extracción de compuestos que pudieron ejercer algún fenómeno de copigmentación con las antocianinas.

Sin embargo, la determinación de eficiencia de extracción de compuestos fenólicos totales (Cuadro 6) pareciera indicar que los tratamientos extraídos con un solvente con mayores concentraciones de etanol (ESL3, ESL5, ESL6 y ESL7) no favorecen particularmente la extracción de estos compuestos, no obstante la cuantificación de compuestos fenólicos usando el reactivo Folin–Ciocalteu tiende a la sobrestimación, ya que además de reaccionar con compuestos fenólicos, reacciona con azúcares reductores y ácidos orgánicos como el ácido ascórbico. Por lo que para una determinación más precisa es necesario cuantificar los compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (Padda *et al.*, 2017). Resultados similares se pueden observar con la determinación de flavonoides totales, los cuales no pareceran indicar que mayores eficiencias de extracción ayudan a estabilizar los pigmentos de Jamaica, para visualizar el fenómeno de copigmentación natural a más detalle se decidió realizar un perfil de flavonoides y fenoles a través de UPLC-PDA.

Cuadro 6. Determinación de compuestos fenólicos totales (CFT) y flavonoides totales (FT)

Tratamiento	CFT	FT
ESL1	2164.6 ± 261.8 ^{ab}	999.0 ± 76.0 ^a
ESL2	2374.1 ± 134.1 ^a	984.8 ± 93.4 ^a
ESL3	1302.9 ± 529.5 ^{cd}	778.1 ± 262.2 ^{ab}
ESL4	2117.0 ± 316.5 ^{ab}	993.0 ± 115.4 ^a
ESL5	1671.1 ± 139.1 ^{bc}	481.3 ± 243.2 ^{bc}
ESL6	1735.5 ± 190.8 ^{bc}	366.4 ± 32.3 ^c
ESL7	2048.3 ± 480.3 ^{ab}	730.0 ± 262.6 ^{abc}
ESL8	929.4 ± 128.1 ^d	825.2 ± 337.2 ^{ab}

Los datos corresponden a 3 repeticiones ± desviación estándar. Las letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

CFT: expresados como mg eq ácido gálico/100 g de muestra

FT: expresados como mg eq catequina/100 g de muestra

6.6. Perfil de compuestos fenólicos, flavonoides y análisis estadístico multivariado.

Para evaluar si el efecto altamente diferenciado en la estabilidad de los pigmentos de Jamaica, tiene relación con el fenómeno de copigmentación natural se realizó una cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides presentes en los pigmentos (Cuadro 7), donde se pudieron identificar y cuantificar alrededor de 15 compuestos fenólicos y 5 flavonoides. En cuanto a los compuestos fenólicos identificados el mayoritario fue el ácido 4-O-Cafeolquínico con una extracción entre 15 a 27 mg/g de muestra, resultados mayores a los obtenidos por Jabeur *et al.*, (2017) quienes lograron una extracción de 1.44 mg/g de ácido 4-O-Cafeolquínico usando un solvente con 80 % de etanol, otros compuestos cuantificados fueron el ácido clorogénico también conocido como ácido 3-O-Cafeolquínico, del cual se logró una extracción de 0.48 a 1.2 mg/g de muestra, resultados un poco menor a

los obtenidos por Jabeur *et al.*, (2017) quienes lograron una extracción de 2.6 mg/g de este compuesto. Por otro lado, Ifie *et al.*, (2017) reportaron una extracción de este compuesto de valores entre 3.1 y 4.9 mg/g. Por otro lado, el ácido gálico se extrajo a una concentración de 0.008 a 0.0267 mg/g de muestra, mientras que Ifie *et al.*, (2017) reportaron extracciones de 0.23 mg/g.

En cuanto al contenido de flavonoides se identificaron y cuantificaron 5, los cuales ya han sido reportados en Jamaica como quercetina, rutina, kaemferol y miricetina (Riaz *et al.*, 2018), sin embargo, las concentraciones de estos compuestos en nuestro estudio son bastante bajas a las reportadas por otros estudios.

Las variaciones en el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos reportadas en este trabajo comparadas con otros trabajos se pueden explicar ya que la recuperación de compuestos fenólicos es altamente variable ya que depende de la variedad de Jamaica utilizada, del solvente utilizado y de la temporada de cosecha de la flor (Ifie *et al.*, 2017; Jabeur *et al.*, 2017; Borrás-Linares *et al.*, 2015; Da-costa-Rocha *et al.*, 2014).

Cuadro 7. Perfil de compuestos fenólicos y flavonoides de diferentes pigmentos de Jamaica

Ácidos fenólicos	R.T.	ESL1	ESL2	ESL3	ESL4	ESL5	ESL6	ESL7	ESL8
Ácido quínico	2.39	6.7 ± 1.8	5.6 ± 0.8	7.7 ± 2.0	5.6 ± 2.4	4.7 ± 1.0	3.6 ± 1.0	8.5 ± 1.7	5.0 ± 1.1
Ácido Shiquímico	2.56	4.0 ± 6.9	3.7 ± 3.3	1.9 ± 1.7	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.5	N.D.	N.D.
Ácido gálico	5.14	2.7 ± 0.9	2.7 ± 0.9	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.2	0.5 ± 0.3	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.0	0.4 ± 0.2
Ácido cafírico	6.72	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	N.D.	0.3 ± 0.0
Ácido protocatecuico	6.77	0.8 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.2	1.1 ± 0.5	0.5 ± 0.2
Ácido clorogénico	7.83	104.8 ± 13.9	112.8 ± 2.8	120.3 ± 9.1	48.6 ± 0.5	49.0 ± 2.4	49.2 ± 2.3	115.7 ± 5.7	49.0 ± 2.9
Ácido 2,5-Dihidroxibenzoico	7.88	0.5 ± 0.5	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Ácido 4-O-Cateoylquínico	8.01	1751.7 ± 143.4	1882.1 ± 109.3	2745.1 ± 285.1	1372.4 ± 146.2	1740.9 ± 264.6	1560.3 ± 333.6	2411.7 ± 404.5	1571.0 ± 176.9
Ácido 4-hidroxybenzoico	8.15	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ácido stringíco	8.92	14.1 ± 3.2	12.5 ± 1.7	13.3 ± 0.9	8.2 ± 1.0	4.7 ± 0.9	6.1 ± 1.2	12.3 ± 0.5	5.7 ± 0.8
Ácido coumárico	9.95	N.D.	N.D.	N.D.	0.2 ± 0.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ácido cateico	9.98	1.1 ± 0.9	2.1 ± 0.9	3.2 ± 1.4	2.1 ± 0.0	4.2 ± 0.8	1.3 ± 0.3	6.7 ± 2.4	2.1 ± 0.5
Ácido elágico	10.09	0.0 ± 0.0	N.D.	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.0	N.D.	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.0
2,4,6 Trihidroxí Benzaldeído	10.10	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.3 ± 0.0	N.D.	1.1 ± 0.5	N.D.
Ácido ferulíco	10.40	1.3 ± 0.5	1.6 ± 0.0	1.3 ± 0.5	2.2 ± 0.5	0.9 ± 0.0	0.7 ± 0.2	3.2 ± 0.8	0.7 ± 0.2
Ácido 3,4/4,5 Dicafeoilquínico	10.75	8.3 ± 1.8	9.6 ± 0.8	16.0 ± 10.0	9.7 ± 2.4	19.8 ± 0.6	10.5 ± 4.4	18.1 ± 5.3	15.7 ± 4.9
Ácido benzoico	11.54	0.5 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.8 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.8 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Ácido salicílico	11.57	60.8 ± 7.6	60.0 ± 5.6	65.9 ± 22.4	48.4 ± 7.0	44.7 ± 3.8	43.6 ± 3.5	63.7 ± 16.2	45.0 ± 1.3
Ácido Trans-Cinámico	13.35	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Flavonoids	R.T.	ESL1	ESL2	ESL3	ESL4	ESL5	ESL6	ESL7	ESL8
Rutina	9.73	1.3 ± 0.4	1.2 ± 1.1	2.2 ± 0.5	1.7 ± 0.1	2.3 ± 0.4	2.0 ± 1.0	2.3 ± 0.5	2.4 ± 0.5
Kaempferol 3-O-Glucosido	10.57	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.3	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.2
Myricetina	12.81	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.4	0.4 ± 0.1	0.8 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.9 ± 0.3	0.6 ± 0.2
Quercetina	12.83	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.8 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.4 ± 0.3
Kaempferol	14.07	N.D.	N.D.	0.1 ± 0.0	N.D.	N.D.	N.D.	0.1 ± 0.0	N.D.

La mayor parte de la investigación sobre Jamaica no da información sobre el origen de la variedad y el sitio de cultivo, lo que hace difícil hacer comparaciones entre el perfil fitoquímico, ya que los extractos obtenidos en diferentes estudios tienen una variabilidad inherente de la variedad y la ubicación de la cosecha (Borrás-Linares *et al.*, 2015).

En la siguiente etapa del proyecto se realizó un análisis estadístico multivariado de componentes principales (PCA), con resultados del perfil fitoquímico de los diferentes tratamientos, esto para determinar si algún compuesto(s) está(n) relacionados a la estabilidad de los diferentes pigmentos de Jamaica, y estos puedan participar como copigmentadores. El concepto principal de PCA es proyectar datos experimentales desde un espacio de alta dimensión en uno de menor dimensión, reemplazando la gran cantidad de variables por una pequeña cantidad de componentes principales no correlacionados que pueden explicar suficientemente la estructura de datos. Los datos experimentales están ordenados de tal manera que la varianza explicada por el primer componente principal es la mayor; la varianza explicada por el segundo componente principal es más pequeña, y así sucesivamente (Borrás-Linares *et al.*, 2015).

En este estudio la suma de la varianza explicada por los dos primeros componentes “component 1” y “component 2” fue de 77.54 % (Figura 11 C, D y E), en la Figura 11 B, se puede apreciar que el compuesto que más afecto hacia el lado positivo del componente 1 y 2 fue miricetina y quercetina respectivamente, mientras que el compuesto que más afecto el lado negativo del componente 1 y 2 fue el ácido caftárico y la rutina respectivamente. Los resultados anteriores se pueden apreciar en la Figura 11 C y 11 B.

En cuanto a la manera en que los tratamientos se agrupan de acuerdo al perfil de compuestos (Cuadro 7), se puede apreciar en la Figura 11 E, que en el lado positivo están los tratamientos ESL3 y ESL7 que se caracterizan por presentar una alta estabilidad, comparados con los tratamientos agrupados en la parte negativa del componente 1 (ESL4 y ESL6), característicos de los tratamientos con una menor estabilidad. En cuanto al componente 2, los tratamientos que se agruparon en la

parte positiva fueron ESL1 y ESL2 con una menor estabilidad, mientras en la parte negativa se agruparon ESL5 y ESL8 con una mayor estabilidad.

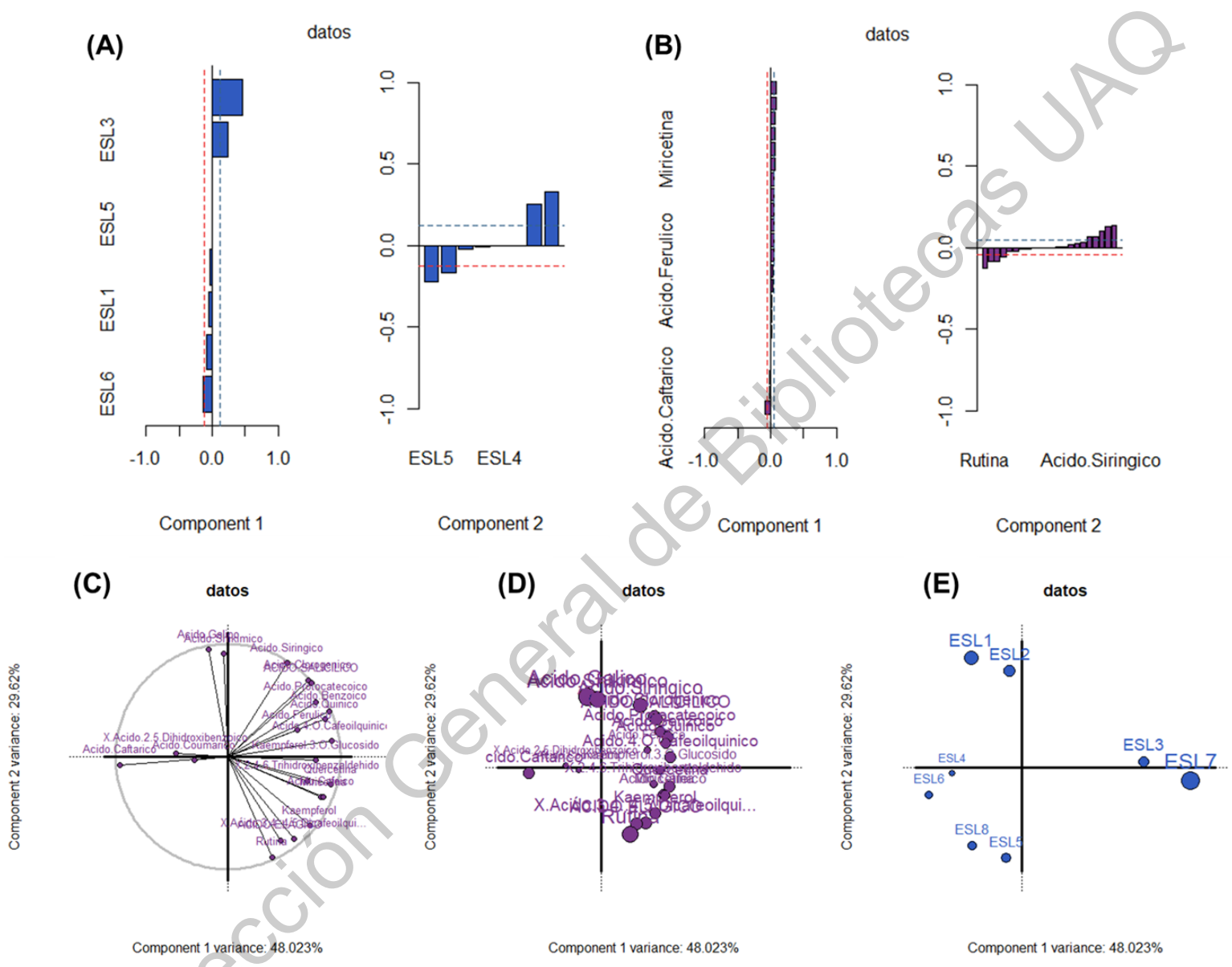


Figura 11. Análisis estadístico multivariado de perfil de compuestos fenólicos y flavonoides de pigmentos extraídos de Jamaica

Lo anterior hace evidente que los diferentes sistemas de extracción son selectivos en cuanto a los compuestos que pueden co-extraer, generando tratamientos con un perfil diferente además que este perfil de compuestos fitoquímicos agrupa a los

tratamientos de estabilidad similar, lo que se puede interpretar, que estos compuestos pueden actuar como copigmentos con las antocianinas lo cual puede incrementar la estabilidad de los pigmentos de Jamaica (Gordillo *et al.*, 2018; Trouillas *et al.*, 2016)

6.7 Extracción de antocianinas de Jamaica por extracción asistida por ultrasonido (EAU).

En la extracción asistida por ultrasonido, las frecuencias ultrasónicas facilitan la hidratación de los tejidos vegetales, ocasionando poros en la pared celular y ocasionalmente rompiendo la pared celular, lo cual ayuda a la transferencia de solvente incrementando la eficiencia de extracción de compuestos de interés (Golmohamadi *et al.*, 2013).

En el presente estudio se evaluó la extracción asistida por ultrasonido tipo baño, en el cual se evaluaron dos frecuencias de extracción 28 y 40 KHz, así como diferentes tiempos de extracción, de 3 a 60 minutos, además se comparó la extracción asistida por ultrasonido, con la extracción convencional, la cual se realizó en un termo baño con agitación.

Los resultados de la eficiencia de extracción tanto de los extractos sólido líquido, como los extractos asistidos por ultrasonido, se muestran en la Figura 12, donde se puede observar que tanto la ESL como en la EAU en la frecuencia de 48 KHz, se presenta un comportamiento tiempo dependiente, donde a mayores tiempos se incrementa la concentración de antocianinas extraídas, si bien el incremento al aplicar ultrasonido a frecuencias de 28 KHz, incrementa el contenido de antocianinas, este incremento es muy ligero comparado con la ESL (11%).

Por otro lado, en la EAU a la frecuencia de 40 KHz también se observa un comportamiento tiempo dependiente, sin embargo a los 60 minutos el contenido de antocianinas de los pigmentos disminuye de manera drástica, esto se puede explicar ya que al disiparse la energía vibratoria como energía calorífica puede incrementar la temperatura del sistema de extracción y las antocianinas son

sumamente sensibles ante cambios de temperatura, lo que puede comprometer su estabilidad (Pinela *et al* 2019).

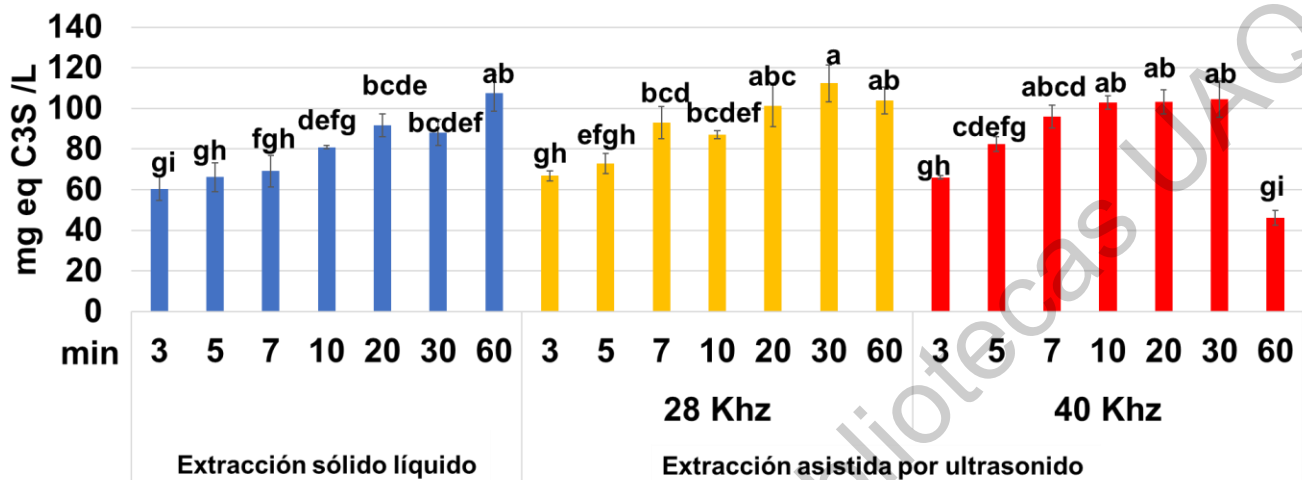


Figura 12. Rendimiento de extracción de antocianinas comparando el sistema de extracción sólido líquido (ESL) y extracción asistida por ultrasonido (EAU).

Lo anterior demuestra que si bien la aplicación de EAU, con un ultrasonido tipo baño se incrementa ligeramente la eficiencia de extracción de antocianinas de Jamaica, principalmente a tiempos cortos, este incremento no es suficiente para la aplicación de esta tecnología, por lo que resulta recomendable la aplicación de una EAU de un sistema tipo sonda, este sistema aplica el poder del ultrasonido en una pequeña superficie, por lo que este sistema es más potente y ampliamente utilizado para la sonicación de pequeños volúmenes de muestra (Chemat *et al.*, 2017). Tal como lo demuestra el reciente trabajo de Pinela *et al.*, (2019), el cual reportó incrementos de 3 veces la extracción de antocianinas de Jamaica utilizando un sistema de extracción de ultrasonido tipo sonda, sin embargo, la estabilidad de estos pigmentos no fue evaluada lo cual es imperativo para su aplicación como colorante alimentario.

A pesar de que no se incrementó la extracción de antocianinas, se planteó determinar la estabilidad de estos pigmentos para lo cual se eligió los tratamientos obtenidos a los 10 y 20 minutos, tanto para los obtenidos mediante ESL, así como los obtenidos mediante EAU en sus dos frecuencias, se eligió estos dos tiempos,

ya que en los tratamientos obtenidos mediante EAU se acercan a los picos máximos de extracción. En la Figura 13 se puede observar las fotos de los pigmentos seleccionados ajustados a una concentración de 22.5 mg/L de antocianinas, así como a las 2 y 5 horas de ser sometidos a una degradación acelerada a 80 °C, donde se puede apreciar una ligera tonalidad más rojiza a las 5 h en las muestras extraídas con EAU a 28 Khz.

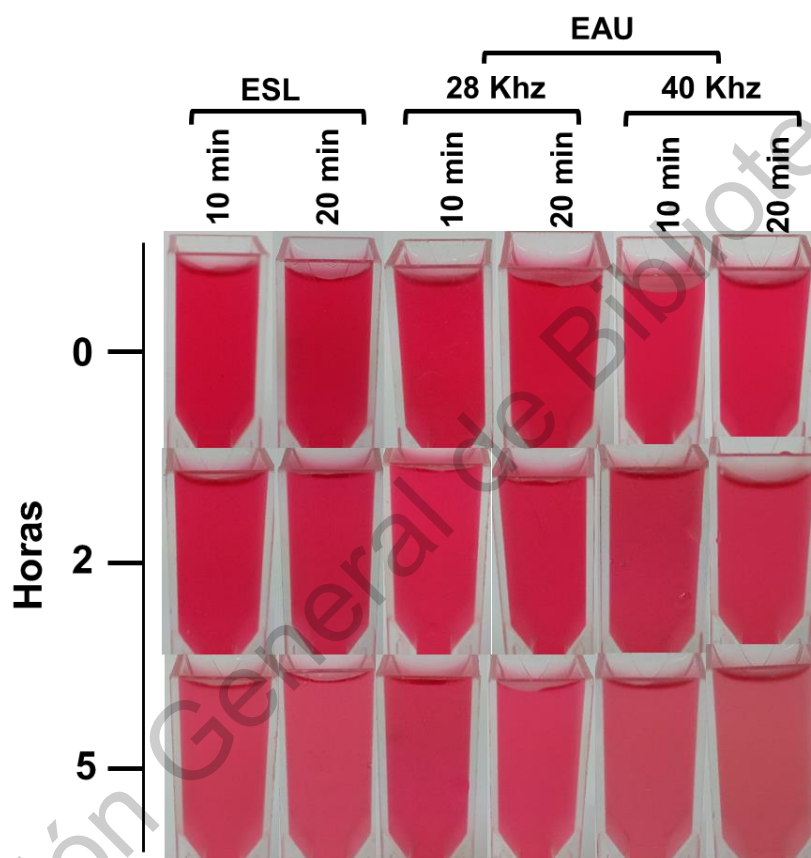


Figura 13. Degradación de pigmentos de Jamaica extraídos mediante ESL y EAU sometidos a 80 °C durante 5 horas.

En la Figura 14, se puede apreciar el índice de pardeamiento de pigmentos de Jamaica extraídos mediante ESL y EAU, donde se puede empezar a ver una tendencia donde los pigmentos extraídos por el método convencional ESL, así como el pigmento extraído por EAU con el tiempo y la frecuencia más baja (28 Khz) tienen los índices de pardeamiento más bajos. Mientras los tratamientos obtenidos por la

EAU a alta frecuencia (40 Khz) y tiempos más altos tienden a degradarse más rápido.

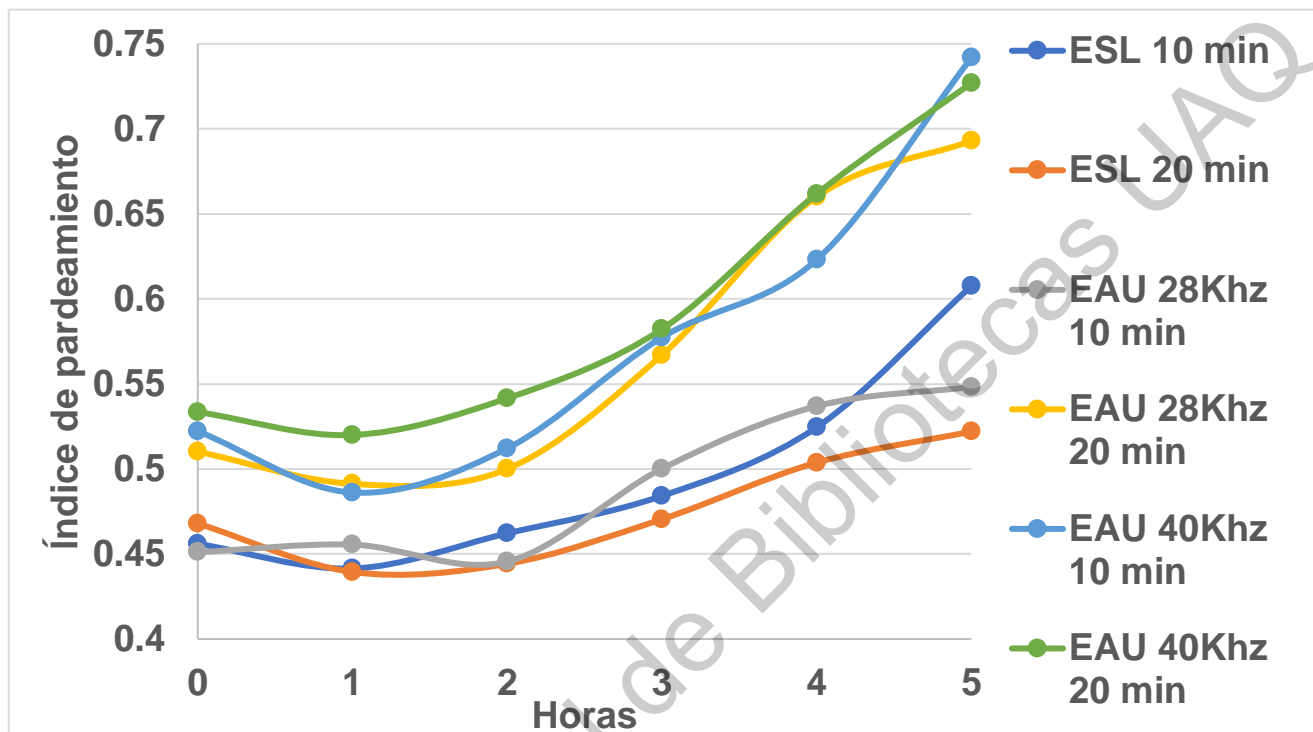


Figura 14. Índice de pardeamiento de pigmentos de Jamaica extraídos mediante ESL y EAU sometidos a 80 °C durante 5 horas

Lo cual se puede explicar, ya que al incrementar el tiempo y la frecuencia, incrementa la energía aplicada en el sistema de extracción, lo que a consecuencia genera un incremento en la temperatura resultando en mayores tasas de degradación de pigmentos. Esta información resulta interesante ya que Pinela *et al.*, (2019), lograron incrementar la eficiencia de extracción de antocianinas de Jamaica, sin embargo no evaluaron la estabilidad de las mismas, y lo encontrado en nuestro estudio demuestra que la aplicación de ultrasonido puede afectar la estabilidad de los pigmentos.

6.8 Adición de copigmentadores para incrementar la estabilidad de pigmentos de Jamaica.

Tal y como lo define Trouillas *et al.*, (2016) la copigmentación es un proceso natural basado en complejos no covalentes el cual es un mecanismo por el cual los colores son modulados y estabilizados en flores, frutas y vegetales, así como en alimentos. En este proceso las antocianinas pueden formar enlaces supramoleculares fácilmente con otros pigmentos y cofactores, llamados en este caso, copigmentos.

Se han reportado una gran variedad de compuestos que pueden ser adicionados a soluciones de antocianinas y los cuales pueden mejorar la estabilidad de las mismas disminuyendo su degradación en el almacenamiento, en este contexto se han reportado a compuestos como gomas (Guan *et al.*, 2016), extractos vegetales (Chung *et al.*, 2017), péptidos (Chung *et al.*, 2017), proteínas (He *et al.*, 2015) y compuestos fenólicos (Qian *et al.*, 2017).

En este trabajo se decidió evaluar el efecto de diferentes copigmentadores de diversa naturaleza sobre la estabilidad de pigmentos de Jamaica, para lo anterior se utilizó el tratamiento ESL3, el cual mostró un mejor comportamiento en cuanto a estabilidad, este extracto fue ajustado a pH 3 y a una concentración de 22.5 mg/L de antocianinas, se le adicionó 1% de diferentes copigmentadores, en cuanto a extractos vegetales se utilizó un extracto de garcinia cambogia, para gomas y carbohidratos se adicionó goma guar, garrofin, xantana, inulina y CMC. En cuanto a proteínas y aminoácidos se utilizó la proteína alfa-lacto-albúmina, los hidrolizados de proteína de leche "Bio3" y "Bio 7" y concentrado de suero de leche "WPC". Y como ácidos fenólicos se adicionó el ácido gálico.

En la Figura 15 se puede apreciar que ningún copigmentador con excepción del ácido gálico mostró un efecto protector sobre las antocianinas de Jamaica, e incluso algunos como el extracto de garcinia cambogia induce degradación de los pigmentos de Jamaica, lo anterior se puede explicar, con los ácidos orgánicos de garcinia cambogia, los cuales se encuentran en altas concentraciones, como el ácido hidroxicítrico, se ha reportado que algunos ácidos orgánicos como el

ascórbico tienen un efecto altamente degradante en las antocianinas (Chung *et al.*, 2016).



Figura 15. Degradación de pigmentos de Jamaica adicionados con (1%) de diferentes copigmentadores y sometidos a 8 horas de degradación acelerada a 80 °C.

Por otro lado, es probable que el ácido gálico tenga un buen efecto copigmentador debido a su sistema π conjugado, los sistemas π conjugados extendidos lo que favorece las interacciones π - π , lo cual puede modular el color e incrementar la estabilidad de las antocianinas (Trouillas *et al.*, 2016).

Posteriormente al verificar que el ácido gálico fue el mejor candidato para ser adicionado a pigmentos de jamaica como copigmentador se decidió evaluar su efecto como copigmentador, ya que se ha reportado que en algunos copigmentadores varían el efecto que tienen en las antocianinas dependiendo fuertemente de la relación pigmento:copigmento (Trouillas *et al.*, 2016; Grajeda-Iglesias *et al.*, 2016; Chung *et al.*, 2015).

En la Figura 16 se muestra que al adicionar diferentes concentraciones del ácido gálico, disminuye la degradación de la coloración roja de las antocianinas después de someterse a una degradación acelerada a 80 °C, después de 8 horas,

observándose un comportamiento concentración dependiente, esto se podría explicar, ya que un compuesto fenólico con sistemas pi deslocalizados, estos pueden tener reacciones con las antocianinas tipo apilamiento pi-pi lo cual puede proteger a las antocianinas de manera estructural, incrementando su coloración y aumentando su estabilidad (Trouillas *et al.*, 2016).

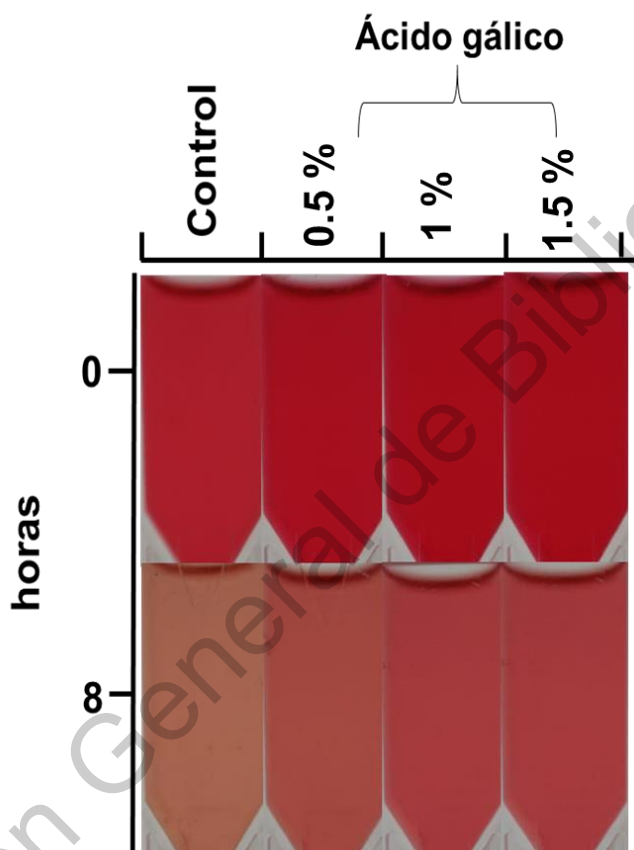


Figura 16. Efecto de la adición de ácido gálico en la estabilidad de pigmentos de Jamaica sometidos a 80 °C 8 horas.

En la Figura 17 se puede apreciar que la adición, de ácido gálico produce un fuerte efecto hiperocrómico, ya que al adicionar este compuesto a los pigmentos de Jamaica se incrementa la absorbancia máxima hasta en un 49 %, lo cual es de ventaja tecnológica, ya que significa que con menos concentración de pigmentos se puede generar una mayor intensidad de color con pigmentos copigmentados, por otro lado se puede apreciar un ligero efecto batocrómico, ya que con la adición de este compuesto se mueve el pico máximo de la absorbancia de 520 nm a 530 nm.

Lo que indica que estos dos compuestos presentan interacciones (Trouillas *et al.*, 2016).

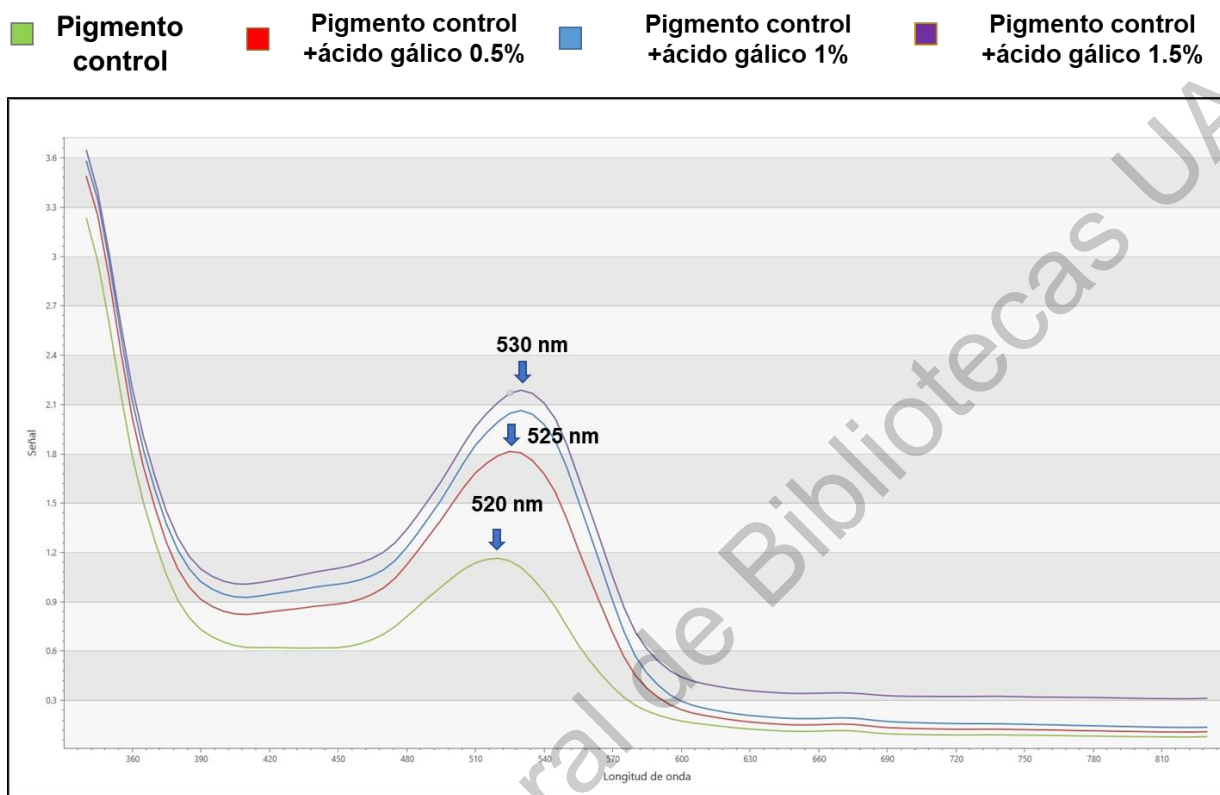


Figura 17. Efecto batocrómico e hiperocrómico al adicionar ácido gálico a pigmentos de Jamaica.

El efecto hiperocrómico es el resultado de un cambio en el estado de equilibrio hacia la forma del catión flavilio, como resultado de la selectiva interacción del pigmento con el copigmento, mientras que el efecto batocrómico representan interacciones pigmento-copigmento (Grajeda-Iglesias *et al.*, 2016).

En la Figura 18 se puede apreciar que con la adición de ácido gálico disminuye el índice de pardeamiento, hasta un 30 % indicando que la adición del copigmento tiene un efecto estabilizante, por otro lado, en la Figura 19 se puede apreciar la absorbancia a 520 nm (representando la coloración roja) que retienen los pigmentos después de ser sometidos a un tratamiento térmico de 80 °C por 8 horas,

obteniéndose que la adición del copigmento incrementa la absorbancia hasta un 87 % comparado con el control.

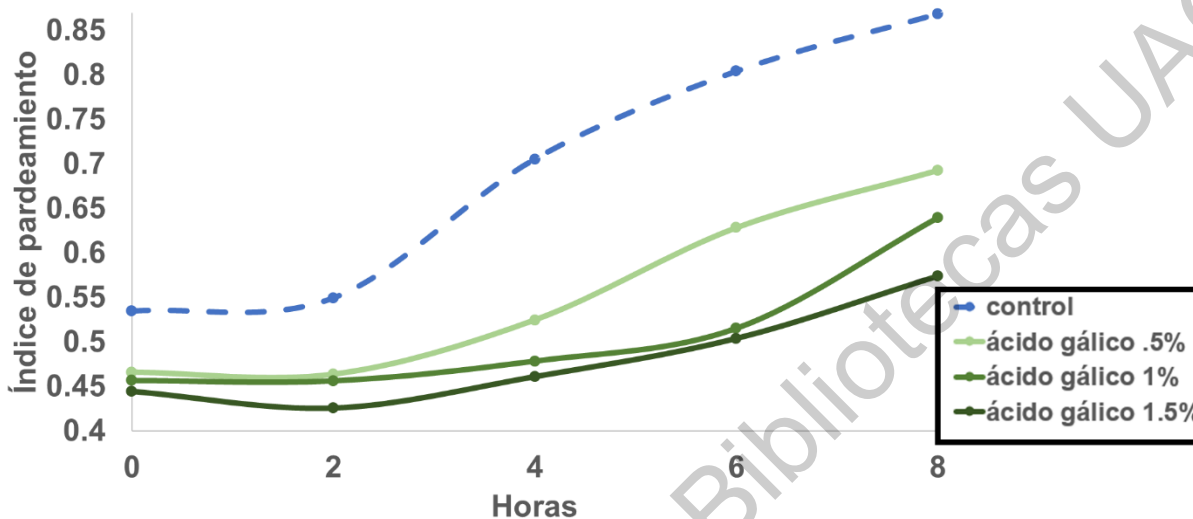


Figura 18. Índice de pardeamiento de extractos de Jamaica, adicionados con ácido gálico a diferentes concentraciones sometidos a 80 °C a pH 3 durante 8 horas

Por otro lado, el ácido gálico, también se evaluó como copigmentador en un modelo de bebidas el cual consistió en antocianinas de Jamaica, adicionadas con benzoato de sodio como conservador, además de carbonato de calcio, ácido cítrico y ascórbico como acidulantes y reguladores de pH, este modelo es ampliamente reportado por Chung *et al.* (2016). Este modelo utiliza ácido ascórbico, para acelerar la degradación de antocianinas. En la Figura 20 se puede apreciar que el tratamiento con vitamina C disminuyó el color de los extractos de jamaica al someterse a 40 °C, esta degradación rápida se puede atribuir a la adición de vitamina C.

Lo anterior concuerda con otros estudios como el de Chung *et al.*, 2016 donde se observó que la adición de vitamina C reduce la estabilidad de las antocianinas en sistemas de bebidas, la degradación del color en la presencia de ácido ascórbico se ha atribuido a dos mecanismos: (a) reacciones de condensación entre antocianinas y el ácido ascórbico y (b) la autooxidación del ácido ascórbico genera

radicales libres que rompen el catión flavilio de las antocianinas (West & Mauer, 2013).

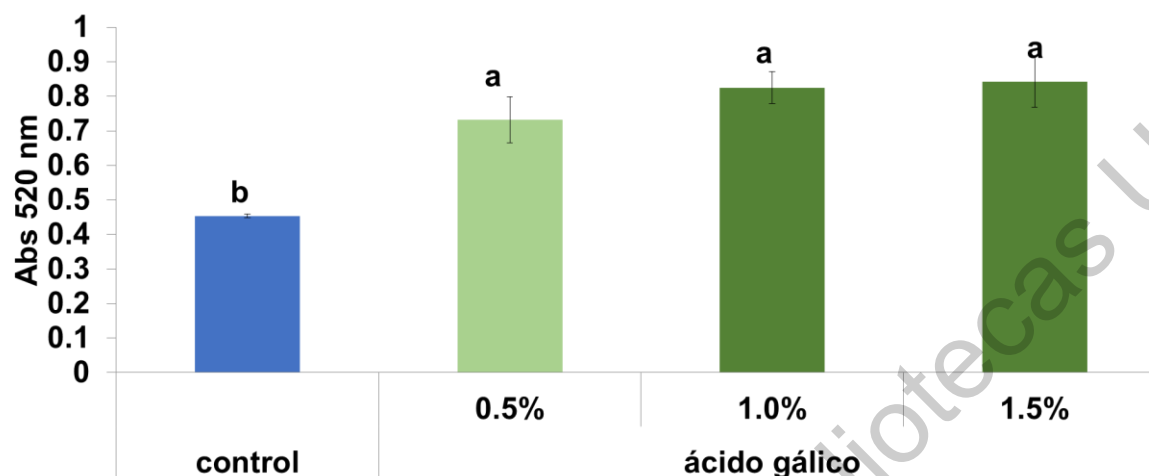


Figura 19. Absorbancia a 520 nm de extractos de Jamaica, adicionados con ácido gálico a diferentes concentraciones sometidos 8 horas a 80 °C, pH 3 después de 8 horas de almacenamiento.

En este estudio se adicionó vitamina C y antocianinas en un modelo de bebidas, donde se estudió el potencial estabilizante de adicionar ácido gálico en diferentes concentraciones (0.5, 1 y 1.5%) y su efecto para incrementar la estabilidad y prevenir la degradación de color de pigmentos de Jamaica (Figura 21). Se puede observar un incremento importante en la retención de color al adicionar ácido gálico en el modelo de bebidas, también es de mencionar que se observó un efecto dosis dependiente, donde a mayor concentración de ácido gálico, de manera visual se puede apreciar una mayor retención de coloración roja característica de las antocianinas. Este comportamiento ya se ha reportado en trabajos como en el de Grajeda-Iglesias *et al.* (2016), donde se indica que la tasa de concentración molar entre copigmentos y pigmento afecta de manera importante el efecto de la copigmentación.

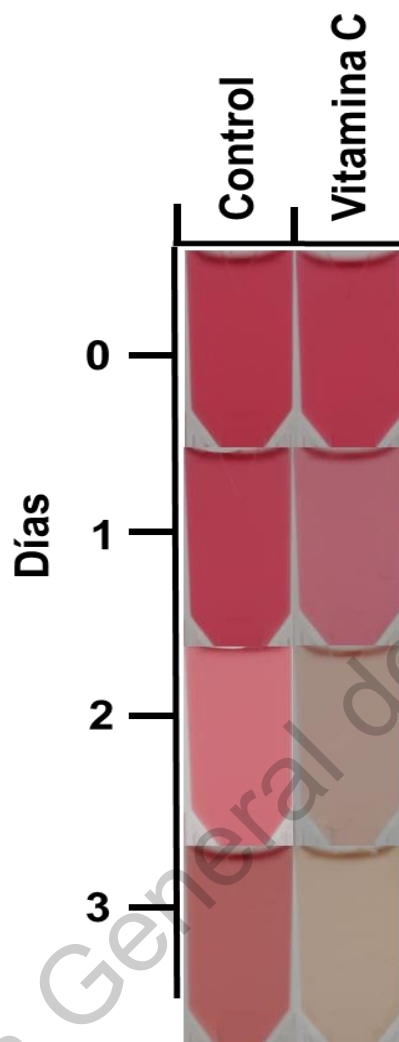


Figura 20. Efecto de la adición de ácido ascórbico en la degradación de pigmentos de jamaica a 40 °C durante 3 días de almacenamiento.

En la Figura 22 se presenta la degradación de antocianinas durante 3 días en un modelo de bebidas, utilizando ácido ascórbico como agente pro-degradante, donde se logro un incremento de hasta el 120-190 % en la retención de antocianinas después de 3 días. Por otro lado, en la Figura 23 se presenta el efecto estabilizante de la adición de ácido gálico sobre los pigmentos de Jamaica sobre el índice de pardeamiento, el cual disminuye hasta un 35.9 % con la adición de ácido gálico.

Lo anterior indica que el ácido gálico es un fuerte candidato a utilizarse como copigmentador debido a los fuertes efectos estabilizantes que puede conferir a los pigmentos de Jamaica, tanto en una solución amortiguadora como en un modelo de bebidas, por otro lado este efecto puede atribuirse a las reacciones de apilamiento pi-pi, donde los 3 electrones pi deslocalizados del ácido gálico posiblemente estén interactuando con los electrones deslocalizados del anillo C de las antocianinas, donde estas interacciones no covalentes posiblemente impidan la hidratación de las antocianinas y su posterior ataque nucleofílico el cual rompe el anillo C de las antocianinas, haciendo que cambien su estructura a chalconas lo cual produce cambios de color en los pigmentos (Trouillas *et al.*, 2016).

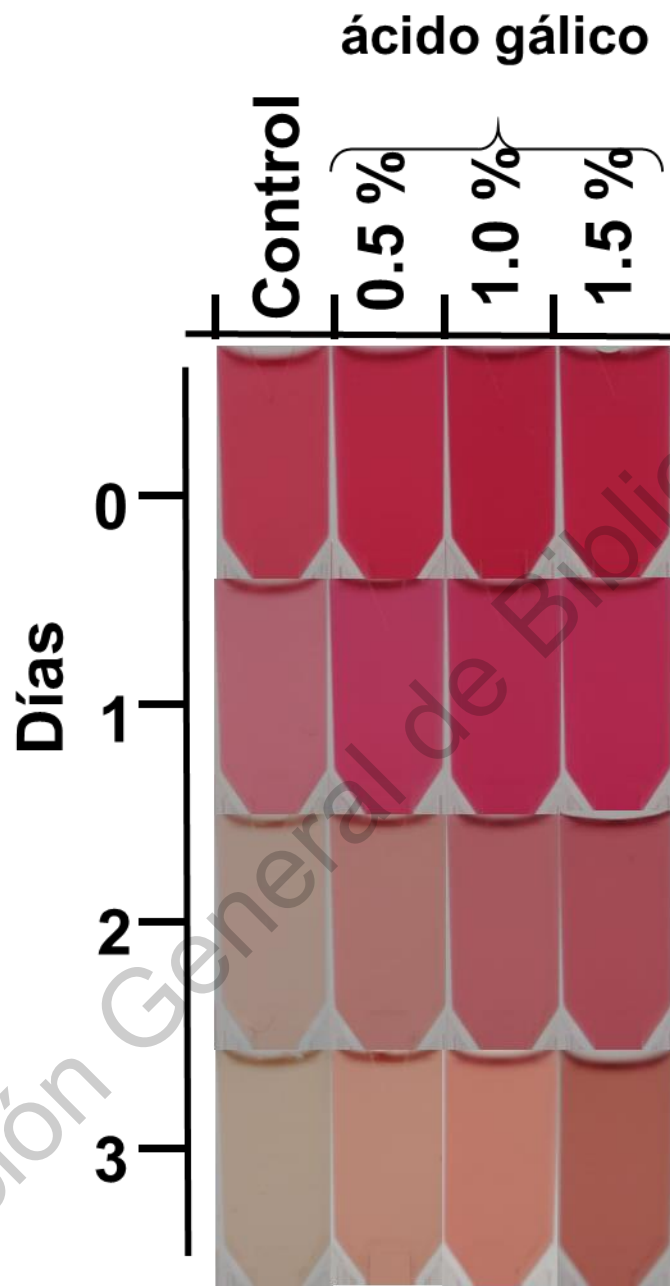


Figura 21. Efecto de la adición de ácido gálico en un modelo de bebidas, almacenado a 40 °C durante 3 días.

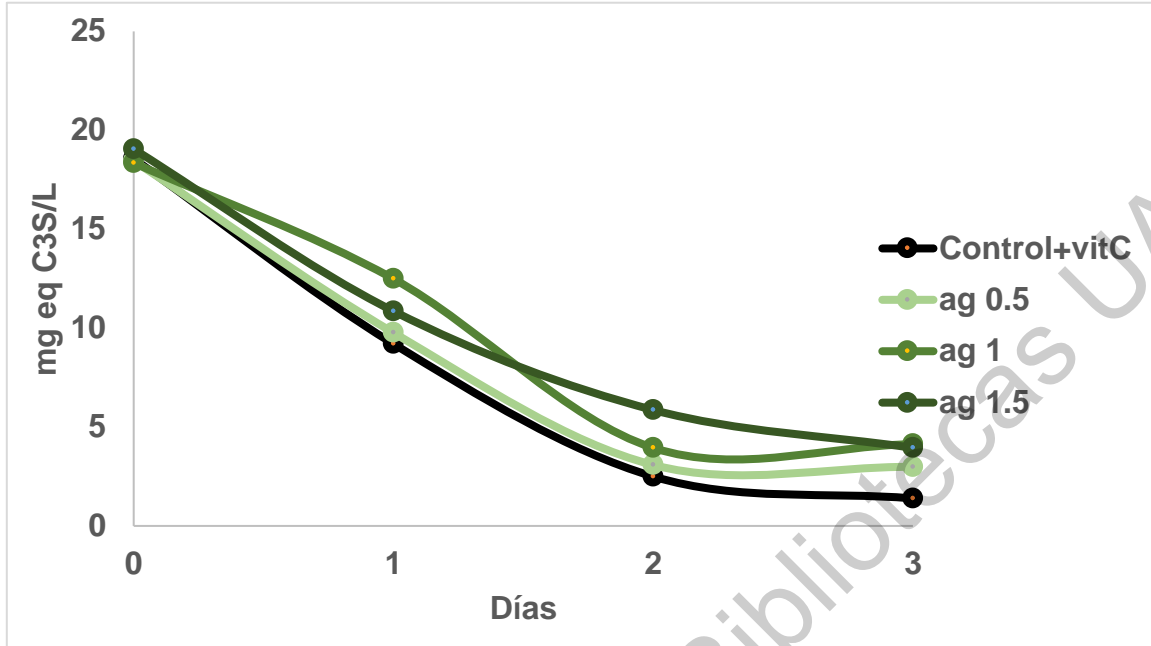


Figura 22. Degradación de antocianinas de pigmentos de Jamaica, con la adición de ácido gálico en un modelo de bebidas, almacenado a 40 °C durante 3 días.

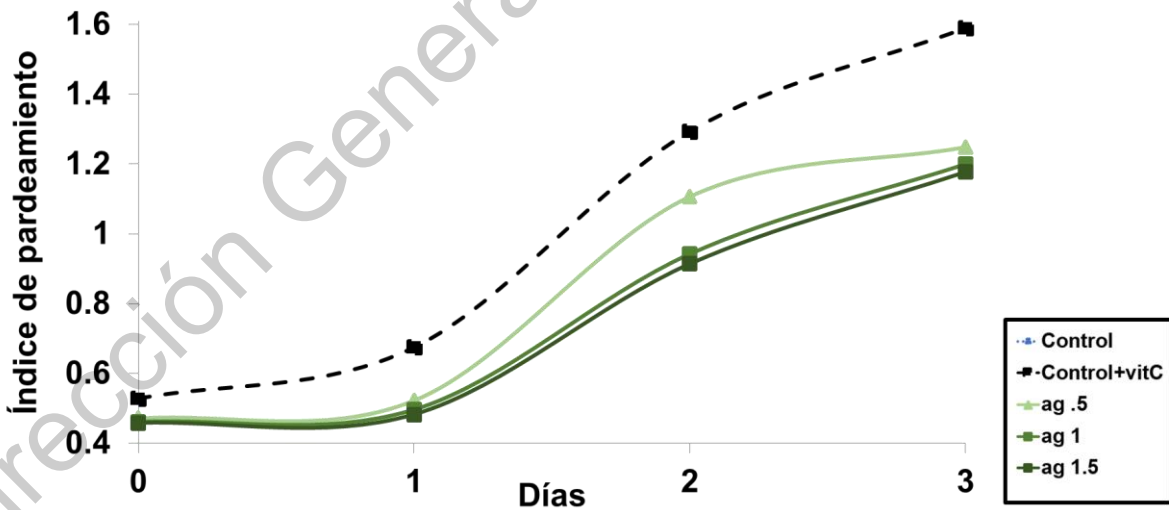


Figura 23. Índice de pardeamiento de pigmentos de Jamaica, con la adición de ácido gálico en un modelo de bebidas, almacenado a 40 °C durante 3 días.

VII. Conclusiones

1. La proporción sólido solvente, es el factor que más influye en el rendimiento de extracción de antocianinas de Jamaica, mientras que para la estabilidad, el solvente tiene un mayor efecto, la mayor estabilidad se observó a mayores concentraciones de etanol.
2. Los análisis estadísticos multivariados parecen agrupar a los tratamientos de acuerdo al perfil fitoquímico en función a la estabilidad de los pigmentos agrupando los tratamientos que mostraron más estabilidad y los menos estables, lo que podría indicar que los compuestos que se están co-extrayendo podrían tener un efecto de copigmentación natural
3. El sistema de extracción asistida por ultrasonido tipo baño no mejoró la eficiencia de extracción de antocianinas de Jamaica pero disminuye su estabilidad.
4. La adición de ácido gálico incrementa la estabilidad de los pigmentos de Jamaica a pH 3 y en un modelo de bebidas de manera dosis dependiente y tiene un importante efecto hipercrómico y batocrómico.
5. La extracción de pigmentos de jamaica con agua:etanol acidificado, mejoran la estabilidad de estos compuestos, lo cual puede ser potenciado con la adición de ácido gálico.

VIII. Referencias

- Amchova P., Kotolova H., & Ruda-Kucerova J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73, 914–922.
- Barnes J., Nguyen H., Shen S., & Schug K. (2009). General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 4728–4735.
- Barrows, J. N., Lipman, A. L., & Bailey, C. J. (2003). Color additives: FDA's regulatory process and historical perspectives. *Food Safety Magazine*,
- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P. A., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., ... & Segura-Carretero, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, 69, 385-394.
- Brouillard, R., & Delaporte, B. (1977). Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *Journal of the American Chemical Society*, 99(26), 8461-8468.
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of food science*, 68(1), 240-248.
- Carocho M., Barreiro M., Morales P., & Ferreira I. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 377–99.
- Carvajal-Zarrabal O., Hayward-Jones P.M., Orta-Flores Z., Nolasco-Hipolito C., Barradas-Dermitz D.M., Aguilar-Uscanga M.G. (2013) Effect of *Hibiscus sabdariffa* L. dried calyx ethanol extract on fat absorption-excretion, and body weight implication in rats. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 1-5
- Castañeda-ovando A., Pacheco-hernández M., Páez-hernández M., Rodríguez J., & Galán-Vidal C. (2009). Chemical studies of anthocyanins : A review. *Food Chemistry*, 11, 859–871.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications.

A review. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 540-560.

Chung C., Rojanasasithara T., Mutilangi W., & McClements, D. J. (2016). Enhancement of colour stability of anthocyanins in model beverages by gum arabic addition. *Food Chemistry*, 201, 14–22.

Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W., & McClements, D. J. (2017). Stability improvement of natural food colors: impact of amino acid and peptide addition on anthocyanin stability in model beverages. *Food chemistry*, 218, 277-284.

Chung, C., Rojanasasithara, T., Mutilangi, W., & McClements, D. J. (2015). Enhanced stability of anthocyanin-based color in model beverage systems through whey protein isolate complexation. *Food Research International*, 76, 761-768.

CIE Commission Internationale de l'Eclairage. (2004). Technical Report Colorimetry (Vol. 552). (CIE),

CIE Commission Internationale de l'Eclairage. (2015). Selected Colorimetric Tables.

Cissé, M., Bohuon, P., Sambe, F., Kane, C., Sakho, M., & Dornier, M. (2012). Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 16-21.

Codex Alimentarius. (2015). codex Stan 192, 1995. Norme générale Codex pour les additifs alimentaires

Cortez R., Luna-Vital D. A., Margulis D., & Gonzalez de Mejia, E. (2017). Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, 180–198.

Da-Costa-Rocha I., Bonnlaender B., Sievers H., Pischel I., & Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L. - A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*, 165, 424–443.

Dai-J., Gupte-A., Gates L., Mumper R.J. (2009). A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: Extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*. 47, 837–847

Domínguez-López A., Remondetto G., & Navarro-Galindo S. (2008). Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L. cv. 'Criollo'). *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 322–325

Du, C. T., & Francis, F. J. (1973). Anthocyanins of roselle (*Hibiscus sabdariffa*, L.). *Journal of Food Science*, 38(5), 810-812.

- Duffus J., Nordberg M., & Douglas M. T. (2007). Glossary of terms used in toxicology, 2nd edition. Pure and Applied Chemistry, 79, 1153–1344.
- EC. (1994). European Parliament and Council Directive 94/36/EC of 30 June 1994 on colours for use in foodstuffs. Diario Oficial de Las Comunidades Europeas, 237, 13–29.
- EFSA. (2009). Scientific Opinion on the re-evaluation of Azorubine/Carmoisine (E 122) as a food additive - EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). The EFSA Journal, 711, 1–40.
- Garofulic I., Dragovic-Uzelac V., Jambrak A., & Jukic M. (2013). The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). Journal of Food Engineering, 117, 437–442
- Giusti M., & Wrolstad R. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. Biochemical Engineering Journal, 14, 217–225.
- Golmohamadi A., Möller G., Powers J., & Nindo C. (2013). Effect of ultrasound frequency on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of red raspberry puree. Ultrasonics - Sonochemistry, 20, 1316–1323.
- Gordillo B., Sigurdson T., Lao F., González-Miret L., Heredia J., & Giusti M. (2018). Assessment of the color modulation and stability of naturally copigmented anthocyanin-grape colorants with different levels of purification. Food Research International, 106 791–799.
- Grajeda-Iglesias C., Figueroa-Espinoza M.C., Barouh N., Barea B., Fernandes A., V. de Freitas V., *et al.* (2016). Isolation and characterization of anthocyanins from Hibiscus sabdariffa flowers. Journal of natural products, 79. 1709-1718
- Guan Y., & Zhong Q. (2015). The improved thermal stability of anthocyanins at pH 5.0 by gum arabic. Food Science and Technology, 64, 706-712
- Gurrola-Diaz, C. M., Garcia-Lopez, P. M., Sanchez-Enriquez, S., Troyo-Sanroman, R., Andrade-Gonzalez, I., & Gomez-Leyva, J. F. (2010). Effects of Hibiscus sabdariffa extract powder and preventive treatment (diet) on the lipid profiles of patients with metabolic syndrome (MeSy). Phytomedicine, 17, 500–505.
- He W., Zeng M., Chen J., Jiao Y., Niu F., Tao G., & He Z. (2016). Identification and Quantitation of Anthocyanins in Purple-Fleshed Sweet Potatoes Cultivated in China by UPLC-PDA and UPLC-QTOF-MS/MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 64, 171–177.

- Hubbermann, E. M., Heis, A., Stöckmann, H. & Schwarz, K. (2006). Influence of acids, salt, sugars and hydrocolloids on the colour stability of anthocyanin rich black currant and elderberry concentrates. *European Food Research and Technology*, 223, 83-90.
- Kopjar, M., Jaksic, K. & Pilizota, V. (2012). Influence of sugars and chlorogenic acid
- Ifie, I., Ifie, B. E., Ibitoye, D. O., Marshall, L. J., & Williamson, G. (2018). Seasonal variation in *Hibiscus sabdariffa* (Roselle) calyx phytochemical profile, soluble solids and α -glucosidase inhibition. *Food chemistry*, 261, 164-168.
- Institute of Food Technologists. (2016). *Coloring Foods & Beverages*. Revisado en mayo 6 del 2018. Tomado de <https://www.ift.org/>
- Ivanovic J., Tadic V., Dimitrijevic S., Stamenic M., Petrovic S., Zizovic I. (2014). Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar "Čačanska Bestrna". *Industrial Crops and Products*, 53, 274-281
- Jabeur, I., Pereira, E., Barros, L., Calhelha, R. C., Soković, M., Oliveira, M. B. P., & Ferreira, I. C. (2017). *Hibiscus sabdariffa* L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents. *Food research international*, 100, 717-723.
- Khafaga, E. R., Koch, H., El Afry, M. M. F., & Prinz, D. (1980). Stage of maturity and quality of karkadeh (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*). 1. Organic acids. 2. Anthocyanins. 3. Mucilage, pectin and carbohydrates. 4. Improved drying and harvesting systems. *Angewandte Botanik*, 54(5/6), 287-318.
- Kheng, L. W. (2002). Color spaces and color-difference equations. *Color Research and Application*, 24, 186–198.
- Lee J., Durst R., & Wrolstad R. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88, 1269-78.
- Lin H., Chan K., Sheu J., Hsuan S., Wang C., Chen J. (2012). *Hibiscus sabdariffa* leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Food Chemistry* 132, 880-891
- López, C. J., Caleja, C., Prieto, M. A., Barreiro, M. F., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2018). Optimization and comparison of heat and ultrasound assisted extraction techniques to obtain anthocyanin compounds from *Arbutus unedo* L. fruits. *Food chemistry*, 264, 81-91.
- Luna-Vital, D., Cortez, R., Ongkowijoyo, P., & de Mejia, E. G. (2018). Protection of

color and chemical degradation of anthocyanin from purple corn (*Zea mays* L.) by zinc ions and alginate through chemical interaction in a beverage model. *Food Research International*, 105, 169-177.

Marić, M., Grassino, A. N., Zhu, Z., Barba, F. J., Brnčić, M., & Brnčić, S. R. (2018). An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. *Trends in food science & technology*, 76, 28-37.

McCann D., Barrett A., Cooper A., Crumpler D., Dalen L., Grimshaw K., Kitchin E., Lok K., Porteous L., Prince E., Sonuga-Barke E., Warner J.O., & Stevenson J. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*, 370, 1560–1567.

Metivier R. P., Francis F. J., & Clydesdale F. M. (1980). Solvent Extraction of Anthocyanins from Wine Pomace. *Journal of Food Science*, 45, 1099–1100.

Muche, B. M., Speers, R. A., & Rupasinghe, H. V. (2018). Storage Temperature Impacts on Anthocyanins Degradation, Color Changes and Haze Development in Juice of “Merlot” and “Ruby” Grapes (*Vitis vinifera*). *Frontiers in nutrition*, 5.

Padda, M. S., & Picha, D. H. (2007). Methodology optimization for quantification of total phenolics and individual phenolic acids in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) roots. *Journal of food science*, 72(7), C412-C416.

Pasquel, A. (2001). Gomas: Una aproximación a la industria de alimentos, *Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*. *Revista Amazónica de Investigación*, 1, 1-8

Pérez-Ramírez, I. F., Castaño-Tostado, E., Ramírez-de León, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., & Reynoso-Camacho, R. (2015). Effect of stevia and citric acid on the stability of phenolic compounds and in vitro antioxidant and antidiabetic capacity of a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *Food chemistry*, 172, 885-892.

Pinela, J., Prieto, M. A., Pereira, E., Jabeur, I., Barreiro, M. F., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2019). Optimization of heat-and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* calyces for natural food colorants. *Food chemistry*, 275, 309-321.

Qian, B. J., Liu, J. H., Zhao, S. J., Cai, J. X., & Jing, P. (2017). The effects of gallic/ferulic/caffeic acids on colour intensification and anthocyanin stability. *Food chemistry*, 228, 526-532.

Reátegui J.L.P., Machado A.P.F., Barbero G.F., Rezende C.A., Martinez J.(2014).

Extraction of antioxidant compounds from balckerry (*Rubus* sp.) bagasse using supercritical CO₂ assisted by ultrasound. *The Journal of Supercritical Fluids*, 94. 223-233

Rein M. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. University of Helsinki, Helsinki (2005) pp. 10–14

Riaz, G., & Chopra, R. (2018). A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 575-586.

Robertson A., & Hall M. N. (1989). A critical investigation into the flavonost method for theaflavin analysis in black tea. *Food Chemistry*, 34, 57–70.

Rodriguez-Amaya D., (2015). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20–26.

Rostagno, M. A., & Prado, J. M. (Eds.). (2013). Natural product extraction: principles and applications (No. 21). Royal Society of Chemistry.

SAGARPA. (2012). Plan rector nacional sistema producto Jamaica. Comité nacional sistema producto Jamaica.

Sensient food colors (Mayo, 2018). ¿Los colores naturales son realmente menos estables que los colores artificiales? Revisado septiembre 20 del 2018, tomado de <https://sensientfoodcolors.com/es-la/id/los-colores-naturales-son-realmente-menos-estables-que-los-colores-artificiales/>

SIAP. (2017). Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera. Recuperado de: Revisado junio 10 del 2018. Tomado de <https://www.gob.mx/siap>

Sigurdson T., Robbins J., Collins M., & Giusti M. (2018). Impact of Location, Type, and Number of Glycosidic Substitutions on the Color Expression of o-dihydroxylated Anthocyanidins. *Food Chemistry*, Under Revi (February), 416–423.

Silva, S., Costa, E. M., Calhau, C., Morais, R. M., & Pintado, M. E. (2017). Anthocyanin extraction from plant tissues: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 3072–3083.

Sindi, H. A., Marshall, L. J., & Morgan, M. R. (2014). Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. *Food chemistry*, 164, 23-29.

Sinela A., Rawat N., Mertz C., Achir N., Fulcrand H., Dornier M. (2017). Anthocyanins degradation during storage of *Hibiscus sabdariffa* extract and evolution of its degradation products. *Food Chemistry*, 214, 234-241.

- Singleton V., & Rossi J. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-15
- Stintzing F., & Carle R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 19–38.
- Sui X., Dong X., & Zhou W. (2014). Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of two anthocyanins in aqueous solution. *Food chemistry*, 192, 516–524.
- Trouillas P., Sancho-García J., De Freitas V., Gierschner J., Otyepka M., & Dangles O. (2016). Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. *Chemical Reviews*, 116, 4937–4982.
- Vatai, T., Škerget, M., Knez, Ž., Kareth, S., Wehowski, M., & Weidner, E. (2008). Extraction and formulation of anthocyanin-concentrates from grape residues. *The journal of supercritical fluids*, 45(1), 32-36.
- Vieira G. S., Cavalcanti R. N., Meireles M. A. A., & Hubinger, M. D. (2013). Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extracts obtained by ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (*Euterpe edulis*). *Journal of Food Engineering* 119, 196–204.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 161-169.
- Wu, H. Y., Yang, K. M., & Chiang, P. Y. (2018). Roselle Anthocyanins: Antioxidant Properties and Stability to Heat and pH. *Molecules*, 23, 1357.
- Yang, L., Gou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F., Zhang, B., & Wu, X. (2012). Antioxidant capacity of extracts from calyx fruits of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *African Journal of Biotechnology*, 11(17), 4063-4068.
- Zhao C., Yu Y., Chen Z., Wen G., Wei F., Zheng Q., & Xiao X. (2017). Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. *Food Chemistry*, 214, 119–128.
- Zozio, S., Pallet, D., & Dornier, M. (2011). Evaluation of anthocyanin stability during storage of a coloured drink made from extracts of the Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.), açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and black carrot (*Daucus carota* L.). *Fruits*, 66(3), 203-215.

IX. Anexos

Anexo 1. Parámetros de color CIELAB, de pigmentos de Jamaica almacenados a 4 °C durante 0, 17, 30 y 45 días

Temperatura	Tiempo	Tratamiento	*L	*a	*b	Hue Angle	Chroma
4 °C	0 días	ESL 1	58.9 ± 4.3	54.5 ± 2.0	17.2 ± 1.3	57.2 ± 1.6	17.5 ± 1.7
		ESL 2	57.7 ± 2.3	56.6 ± 1.3	21.4 ± 0.9	60.5 ± 1.2	20.7 ± 1.0
		ESL 3	57.7 ± 1.4	59.5 ± 1.3	26.1 ± 2.3	65.0 ± 2.1	23.6 ± 1.4
		ESL 4	60.5 ± 1.3	52.9 ± 1.0	17.8 ± 1.2	55.8 ± 1.3	18.5 ± 0.9
		ESL 5	47.3 ± 5.0	50.8 ± 2.9	28.0 ± 1.0	58.0 ± 2.6	28.9 ± 1.8
		ESL 6	58.4 ± 4.3	52.8 ± 2.1	18.6 ± 1.4	56.0 ± 1.8	19.4 ± 1.9
		ESL 7	59.2 ± 2.4	55.8 ± 1.4	25.2 ± 1.9	61.2 ± 1.4	24.3 ± 1.8
		ESL 8	57.1 ± 3.7	53.7 ± 1.3	26.9 ± 2.8	60.1 ± 1.2	26.6 ± 2.7
	17 días	ESL 1	51.7 ± 1.5	47.2 ± 1.0	17.4 ± 1.0	20.3 ± 0.7	50.3 ± 1.3
		ESL 2	49.5 ± 2.5	48.5 ± 1.6	20.6 ± 1.0	23.0 ± 1.3	52.7 ± 1.5
		ESL 3	57.7 ± 2.2	57.6 ± 2.6	23.8 ± 2.4	22.4 ± 1.4	62.3 ± 3.2
		ESL 4	55.2 ± 3.9	46.5 ± 3.6	17.1 ± 0.6	20.3 ± 1.5	49.5 ± 3.3
		ESL 5	51.7 ± 1.8	52.5 ± 1.0	26.0 ± 1.1	26.3 ± 0.9	58.5 ± 1.1
		ESL 6	52.3 ± 4.0	45.9 ± 2.9	17.2 ± 0.9	20.6 ± 1.5	49.0 ± 2.7
		ESL 7	60.9 ± 2.2	55.3 ± 1.7	22.9 ± 2.1	22.5 ± 1.6	59.9 ± 2.2
		ESL 8	58.2 ± 3.2	54.1 ± 1.6	25.5 ± 2.8	25.2 ± 2.3	59.9 ± 2.2
	30 días	ESL 1	61.4 ± 1.9	53.0 ± 2.0	15.3 ± 1.5	16.1 ± 1.3	55.2 ± 2.1
		ESL 2	69.3 ± 7.8	39.0 ± 17.1	15.3 ± 2.7	37.3 ± 9.3	42.3 ± 16.3
		ESL 3	57.5 ± 3.8	58.0 ± 3.6	23.6 ± 3.5	22.1 ± 2.4	62.6 ± 4.2
		ESL 4	59.0 ± 8.9	46.2 ± 6.7	16.4 ± 1.6	19.9 ± 3.8	49.1 ± 6.2
		ESL 5	52.6 ± 5.2	53.3 ± 3.3	26.3 ± 1.3	26.4 ± 2.0	59.4 ± 2.9
		ESL 6	60.9 ± 7.0	48.4 ± 3.9	16.3 ± 1.0	18.7 ± 2.5	51.1 ± 3.4
		ESL 7	60.8 ± 1.4	55.6 ± 1.4	22.8 ± 1.2	22.3 ± 0.9	60.1 ± 1.6
		ESL 8	58.2 ± 3.0	54.6 ± 1.7	26.2 ± 2.6	25.6 ± 2.1	60.6 ± 2.2
	45 días	ESL 1	50.2 ± 4.2	43.1 ± 2.4	15.8 ± 1.0	45.9 ± 2.3	20.2 ± 1.7
		ESL 2	52.6 ± 6.4	39.6 ± 13.4	18.3 ± 2.1	44.0 ± 11.7	27.6 ± 11.9
		ESL 3	57.0 ± 4.1	55.6 ± 4.0	20.4 ± 3.3	59.3 ± 4.7	20.1 ± 2.2
		ESL 4	52.1 ± 9.1	34.7 ± 10.4	16.8 ± 1.6	38.8 ± 9.7	27.1 ± 6.2
		ESL 5	47.8 ± 3.7	47.7 ± 1.4	23.9 ± 1.4	53.4 ± 1.4	26.6 ± 1.5
		ESL 6	51.2 ± 8.3	35.7 ± 6.6	16.2 ± 1.5	39.2 ± 6.4	24.8 ± 3.5
		ESL 7	61.9 ± 1.6	54.2 ± 1.4	20.5 ± 1.1	57.9 ± 1.6	20.7 ± 0.8
		ESL 8	58.6 ± 2.5	52.4 ± 2.2	23.7 ± 2.3	57.6 ± 2.7	24.3 ± 1.6

Anexo 2: Parámetros de color CIELAB, de pigmentos de Jamaica almacenados a 25 °C durante 0, 17, 30 y 45 días.

Temperatura	Tiempo	Tratamiento	*L	*a	*b	Hue Angle	Chroma
25 °C	0 días	ESL 1	58.9 ± 4.3	54.5 ± 2.0	17.2 ± 1.3	57.2 ± 1.6	17.5 ± 1.7
		ESL 2	57.7 ± 2.3	56.6 ± 1.3	21.4 ± 0.9	60.5 ± 1.2	20.7 ± 1.0
		ESL 3	57.7 ± 1.4	59.5 ± 1.3	26.1 ± 2.3	65.0 ± 2.1	23.6 ± 1.4
		ESL 4	60.5 ± 1.3	52.9 ± 1.0	17.8 ± 1.2	55.8 ± 1.3	18.5 ± 0.9
		ESL 5	47.3 ± 5.0	50.8 ± 2.9	28.0 ± 1.0	58.0 ± 2.6	28.9 ± 1.8
		ESL 6	58.4 ± 4.3	52.8 ± 2.1	18.6 ± 1.4	56.0 ± 1.8	19.4 ± 1.9
		ESL 7	59.2 ± 2.4	55.8 ± 1.4	25.2 ± 1.9	61.2 ± 1.4	24.3 ± 1.8
		ESL 8	57.1 ± 3.7	53.7 ± 1.3	26.9 ± 2.8	60.1 ± 1.2	26.6 ± 2.7
	17 días	ESL 1	41.6 ± 5.1	36.0 ± 5.4	16.7 ± 0.9	25.2 ± 3.3	39.7 ± 5.0
		ESL 2	41.7 ± 6.9	36.5 ± 5.0	18.2 ± 1.6	26.7 ± 2.3	40.8 ± 5.0
		ESL 3	56.4 ± 5.7	52.7 ± 5.3	19.7 ± 3.9	20.4 ± 2.7	56.3 ± 6.0
		ESL 4	51.4 ± 9.2	34.9 ± 6.1	16.6 ± 0.9	25.9 ± 4.4	38.8 ± 5.4
		ESL 5	46.7 ± 5.8	44.8 ± 3.5	20.2 ± 1.6	24.3 ± 1.4	49.1 ± 3.6
		ESL 6	46.0 ± 13.0	33.8 ± 4.1	17.7 ± 1.1	27.8 ± 2.4	38.2 ± 3.9
		ESL 7	63.5 ± 1.3	51.9 ± 1.2	19.3 ± 1.0	20.4 ± 1.0	55.3 ± 1.3
		ESL 8	60.6 ± 2.7	51.1 ± 1.6	22.4 ± 2.2	23.6 ± 1.9	55.8 ± 2.0
	30 días	ESL 1	67.0 ± 3.8	45.1 ± 4.8	12.9 ± 1.2	16.2 ± 2.7	47.0 ± 4.4
		ESL 2	69.0 ± 3.2	41.3 ± 5.1	12.6 ± 2.0	16.9 ± 1.0	43.2 ± 5.4
		ESL 3	61.8 ± 4.3	52.8 ± 5.1	13.7 ± 1.8	14.5 ± 1.9	54.6 ± 5.1
		ESL 4	67.1 ± 5.4	38.0 ± 3.9	13.7 ± 2.0	19.9 ± 2.1	40.4 ± 4.2
		ESL 5	57.1 ± 13.7	42.3 ± 10.7	14.2 ± 3.0	18.9 ± 3.1	44.7 ± 10.8
		ESL 6	67.4 ± 6.0	36.1 ± 5.4	15.3 ± 1.5	23.5 ± 5.5	39.3 ± 4.3
		ESL 7	63.6 ± 1.8	50.0 ± 1.6	18.1 ± 1.6	19.9 ± 1.5	53.2 ± 1.7
		ESL 8	61.1 ± 2.7	49.1 ± 2.8	20.0 ± 3.4	22.2 ± 3.8	53.1 ± 2.6
	45 días	ESL 1	63.9 ± 7.4	36.4 ± 5.9	12.8 ± 2.4	38.7 ± 5.1	19.9 ± 5.4
		ESL 2	61.4 ± 12.1	28.6 ± 3.1	13.0 ± 1.3	31.5 ± 2.8	24.6 ± 3.7
		ESL 3	62.6 ± 9.6	48.4 ± 6.5	11.9 ± 1.7	49.9 ± 6.3	14.0 ± 3.0
		ESL 4	72.0 ± 4.2	21.3 ± 8.5	13.3 ± 1.9	25.5 ± 7.2	34.3 ± 12.5
		ESL 5	61.5 ± 7.4	45.1 ± 3.3	14.0 ± 3.0	47.3 ± 3.0	17.3 ± 4.1
		ESL 6	73.3 ± 4.3	25.5 ± 10.7	16.1 ± 4.9	31.6 ± 5.4	34.8 ± 20.3
		ESL 7	69.7 ± 1.2	44.5 ± 1.8	11.2 ± 0.8	45.9 ± 1.7	14.2 ± 1.2
		ESL 8	66.8 ± 3.5	44.0 ± 2.1	13.1 ± 3.6	46.0 ± 2.4	16.5 ± 4.2

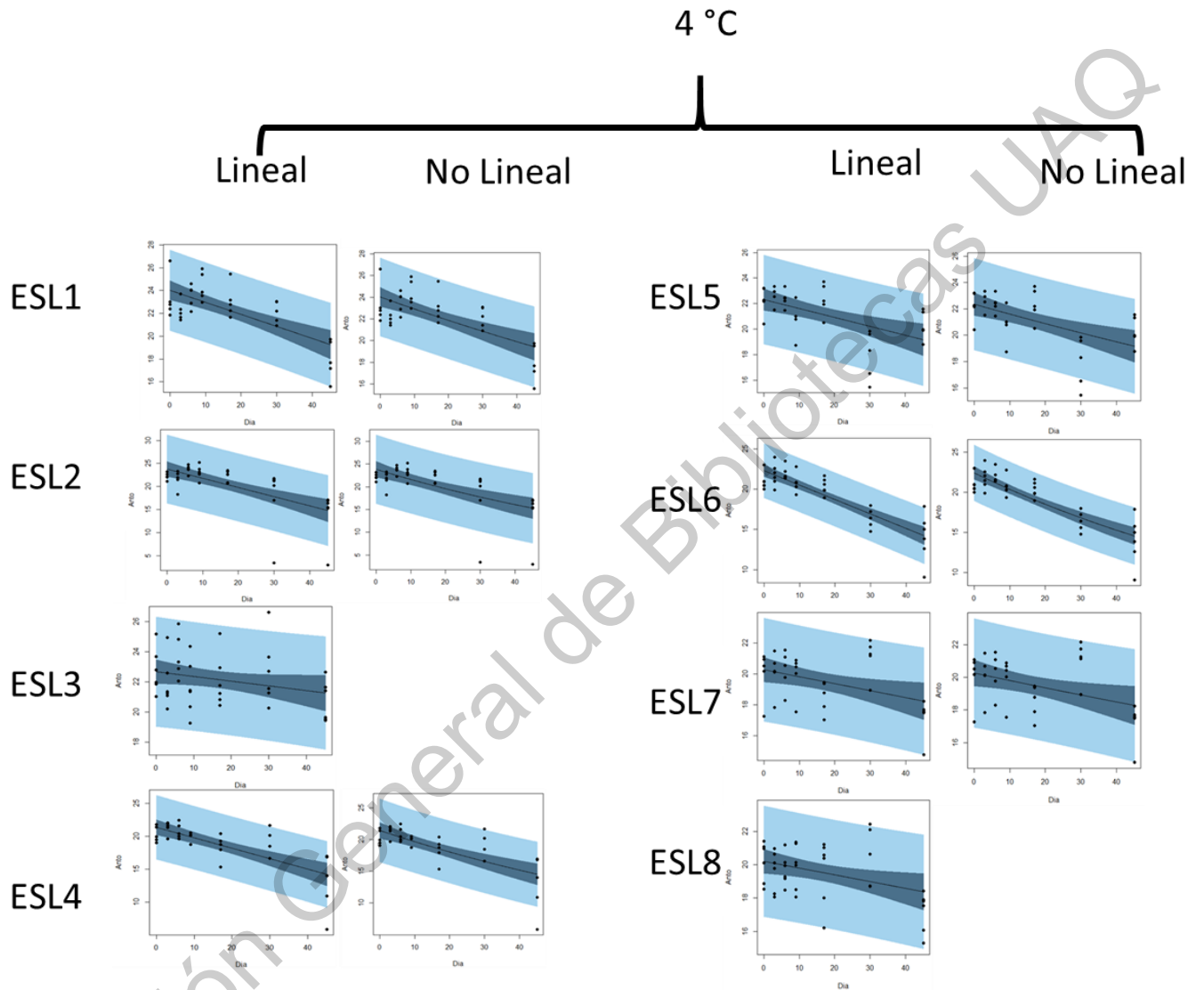
Anexo 3: Parámetros de color CIELAB, de pigmentos de Jamaica almacenados a 35 °C durante 0, 17, 30 y 45 días

Temperatura	Tiempo	Tratamiento	*L	*a	*b	Hue Angle	Chroma
35 °C	0 días	ESL 1	58.9 ± 4.3	54.5 ± 2.0	17.2 ± 1.3	57.2 ± 1.6	17.5 ± 1.7
		ESL 2	57.7 ± 2.3	56.6 ± 1.3	21.4 ± 0.9	60.5 ± 1.2	20.7 ± 1.0
		ESL 3	57.7 ± 1.4	59.5 ± 1.3	26.1 ± 2.3	65.0 ± 2.1	23.6 ± 1.4
		ESL 4	60.5 ± 1.3	52.9 ± 1.0	17.8 ± 1.2	55.8 ± 1.3	18.5 ± 0.9
		ESL 5	47.3 ± 5.0	50.8 ± 2.9	28.0 ± 1.0	58.0 ± 2.6	28.9 ± 1.8
		ESL 6	58.4 ± 4.3	52.8 ± 2.1	18.6 ± 1.4	56.0 ± 1.8	19.4 ± 1.9
		ESL 7	59.2 ± 2.4	55.8 ± 1.4	25.2 ± 1.9	61.2 ± 1.4	24.3 ± 1.8
		ESL 8	57.1 ± 3.7	53.7 ± 1.3	26.9 ± 2.8	60.1 ± 1.2	26.6 ± 2.7
	17 días	ESL 1	57.2 ± 3.4	34.9 ± 1.8	14.3 ± 2.2	22.4 ± 3.8	37.8 ± 1.4
		ESL 2	49.0 ± 9.2	33.4 ± 5.8	14.9 ± 1.5	24.4 ± 3.4	36.6 ± 5.5
		ESL 3	66.0 ± 1.6	52.3 ± 2.7	12.9 ± 1.1	13.8 ± 0.5	53.8 ± 2.9
		ESL 4	55.5 ± 11.3	29.8 ± 3.2	16.4 ± 1.5	29.0 ± 4.1	34.1 ± 2.5
		ESL 5	63.6 ± 2.1	46.4 ± 1.1	12.5 ± 1.1	15.1 ± 1.3	48.1 ± 1.1
		ESL 6	50.8 ± 11.7	27.2 ± 3.8	19.5 ± 3.9	35.6 ± 7.0	33.7 ± 3.4
		ESL 7	68.4 ± 1.0	46.7 ± 2.1	12.1 ± 0.9	14.5 ± 1.5	48.2 ± 1.9
		ESL 8	67.0 ± 1.4	46.6 ± 3.0	11.2 ± 1.3	13.5 ± 0.9	47.9 ± 3.2
	30 días	ESL 1	51.2 ± 8.1	27.0 ± 2.3	14.6 ± 3.1	28.5 ± 6.4	30.9 ± 1.7
		ESL 2	55.5 ± 14.4	23.8 ± 3.4	15.7 ± 4.3	33.3 ± 7.8	28.8 ± 3.5
		ESL 3	69.2 ± 0.9	46.0 ± 2.8	11.4 ± 0.7	14.0 ± 0.2	47.4 ± 2.9
		ESL 4	52.6 ± 15.3	23.7 ± 1.1	17.2 ± 1.6	35.9 ± 1.4	29.3 ± 1.8
		ESL 5	65.3 ± 2.3	41.1 ± 1.3	12.1 ± 0.9	16.4 ± 1.3	42.8 ± 1.2
		ESL 6	49.6 ± 14.7	24.6 ± 3.2	19.0 ± 2.3	37.9 ± 5.0	31.2 ± 2.9
		ESL 7	73.2 ± 1.1	39.6 ± 1.5	10.1 ± 1.0	14.3 ± 1.1	40.9 ± 1.6
		ESL 8	71.8 ± 1.3	42.2 ± 2.1	10.0 ± 0.9	13.3 ± 0.7	43.4 ± 2.2
	45 días	ESL 1	69.4 ± 1.8	22.0 ± 3.1	14.8 ± 2.4	26.6 ± 3.1	34.1 ± 4.8
		ESL 2	38.9 ± 9.2	17.0 ± 2.4	14.7 ± 1.6	22.6 ± 1.8	41.1 ± 5.6
		ESL 3	72.2 ± 2.2	36.8 ± 3.7	11.0 ± 1.3	38.4 ± 3.9	16.6 ± 0.4
		ESL 4	70.2 ± 8.6	18.7 ± 2.8	15.6 ± 2.0	24.4 ± 2.8	39.9 ± 4.8
		ESL 5	71.5 ± 2.6	31.9 ± 1.7	10.1 ± 0.8	33.5 ± 1.6	17.5 ± 1.6
		ESL 6	55.0 ± 8.9	21.3 ± 2.6	18.3 ± 1.5	28.1 ± 2.5	40.7 ± 3.5
		ESL 7	75.8 ± 1.2	31.6 ± 2.2	10.5 ± 0.8	33.3 ± 2.1	18.4 ± 1.8
		ESL 8	76.1 ± 1.7	31.8 ± 2.7	9.1 ± 1.0	33.1 ± 2.8	15.9 ± 1.1

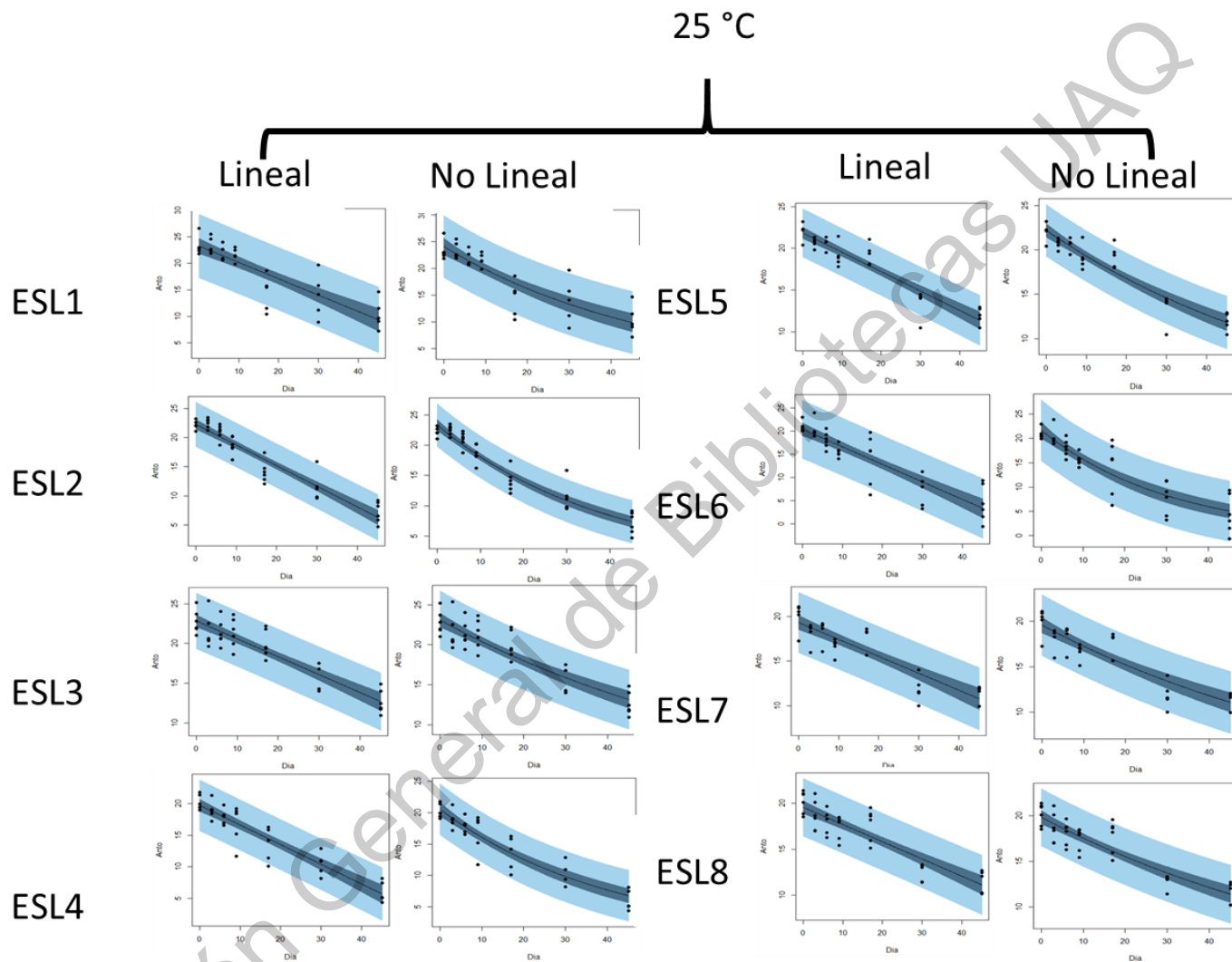
Anexo 4. Parámetros de color CIELAB, de pigmentos de Jamaica almacenados a 45 °C durante 0, 17, 30 y 45 días

Temperatura	Tiempo	Tratamiento	*L	*a	*b	Hue Angle	Chroma
45 °C	0 días	ESL 1	58.9 ± 4.3	54.5 ± 2.0	17.2 ± 1.3	57.2 ± 1.6	17.5 ± 1.7
		ESL 2	57.7 ± 2.3	56.6 ± 1.3	21.4 ± 0.9	60.5 ± 1.2	20.7 ± 1.0
		ESL 3	57.7 ± 1.4	59.5 ± 1.3	26.1 ± 2.3	65.0 ± 2.1	23.6 ± 1.4
		ESL 4	60.5 ± 1.3	52.9 ± 1.0	17.8 ± 1.2	55.8 ± 1.3	18.5 ± 0.9
		ESL 5	47.3 ± 5.0	50.8 ± 2.9	28.0 ± 1.0	58.0 ± 2.6	28.9 ± 1.8
		ESL 6	58.4 ± 4.3	52.8 ± 2.1	18.6 ± 1.4	56.0 ± 1.8	19.4 ± 1.9
		ESL 7	59.2 ± 2.4	55.8 ± 1.4	25.2 ± 1.9	61.2 ± 1.4	24.3 ± 1.8
		ESL 8	57.1 ± 3.7	53.7 ± 1.3	26.9 ± 2.8	60.1 ± 1.2	26.6 ± 2.7
	17 días	ESL 1	59.5 ± 5.7	18.2 ± 1.8	15.0 ± 1.7	39.5 ± 5.6	23.7 ± 0.8
		ESL 2	64.4 ± 0.5	22.9 ± 2.1	16.2 ± 0.4	35.3 ± 2.3	28.1 ± 1.8
		ESL 3	72.3 ± 1.0	40.3 ± 1.9	10.0 ± 0.8	14.0 ± 0.6	41.6 ± 2.1
		ESL 4	64.8 ± 3.4	19.8 ± 3.1	19.1 ± 0.7	44.2 ± 3.9	27.6 ± 2.6
		ESL 5	69.3 ± 2.7	38.3 ± 3.1	12.1 ± 0.9	17.6 ± 0.9	40.2 ± 3.1
		ESL 6	65.0 ± 2.7	21.2 ± 1.4	18.1 ± 1.2	40.5 ± 1.5	27.9 ± 1.7
		ESL 7	74.2 ± 0.7	36.4 ± 1.7	11.3 ± 1.1	17.2 ± 1.6	38.1 ± 1.8
		ESL 8	73.0 ± 1.7	39.4 ± 2.5	10.8 ± 1.2	15.3 ± 1.3	40.8 ± 2.7
	30 días	ESL 1	60.2 ± 7.6	12.0 ± 1.0	16.6 ± 1.2	54.0 ± 1.8	20.5 ± 1.4
		ESL 2	61.5 ± 2.9	15.2 ± 1.3	18.7 ± 1.1	50.9 ± 1.1	24.0 ± 1.7
		ESL 3	74.3 ± 2.0	29.5 ± 2.8	11.6 ± 0.9	21.4 ± 1.3	31.7 ± 2.8
		ESL 4	65.8 ± 6.4	12.4 ± 1.4	19.9 ± 0.5	58.1 ± 2.9	23.5 ± 0.8
		ESL 5	75.8 ± 1.6	25.0 ± 1.4	10.3 ± 0.8	22.3 ± 1.4	27.1 ± 1.5
		ESL 6	67.5 ± 4.1	14.2 ± 2.4	19.7 ± 2.1	54.4 ± 2.8	24.3 ± 2.9
		ESL 7	78.0 ± 1.4	25.4 ± 1.7	11.4 ± 0.6	24.2 ± 2.3	27.8 ± 1.4
		ESL 8	77.9 ± 1.0	25.7 ± 2.4	10.3 ± 0.8	21.9 ± 1.7	27.7 ± 2.4
	45 días	ESL 1	59.1 ± 9.6	8.6 ± 1.9	16.8 ± 1.7	18.9 ± 2.3	63.2 ± 3.0
		ESL 2	70.4 ± 6.8	10.0 ± 1.6	18.0 ± 2.1	20.6 ± 2.6	61.1 ± 1.5
		ESL 3	78.6 ± 1.9	17.9 ± 2.8	11.7 ± 1.2	20.3 ± 3.1	35.8 ± 3.4
		ESL 4	68.0 ± 3.9	10.8 ± 2.1	20.1 ± 1.7	22.9 ± 2.3	62.0 ± 3.5
		ESL 5	78.3 ± 2.9	13.6 ± 3.7	11.8 ± 1.0	18.1 ± 3.3	41.6 ± 5.8
		ESL 6	70.6 ± 1.7	9.4 ± 1.1	19.3 ± 0.7	21.5 ± 1.0	64.0 ± 2.0
		ESL 7	82.1 ± 1.1	14.7 ± 1.5	11.8 ± 0.8	18.9 ± 1.4	38.8 ± 2.9
		ESL 8	81.0 ± 2.6	14.9 ± 2.7	11.5 ± 2.1	18.8 ± 3.2	37.9 ± 3.3

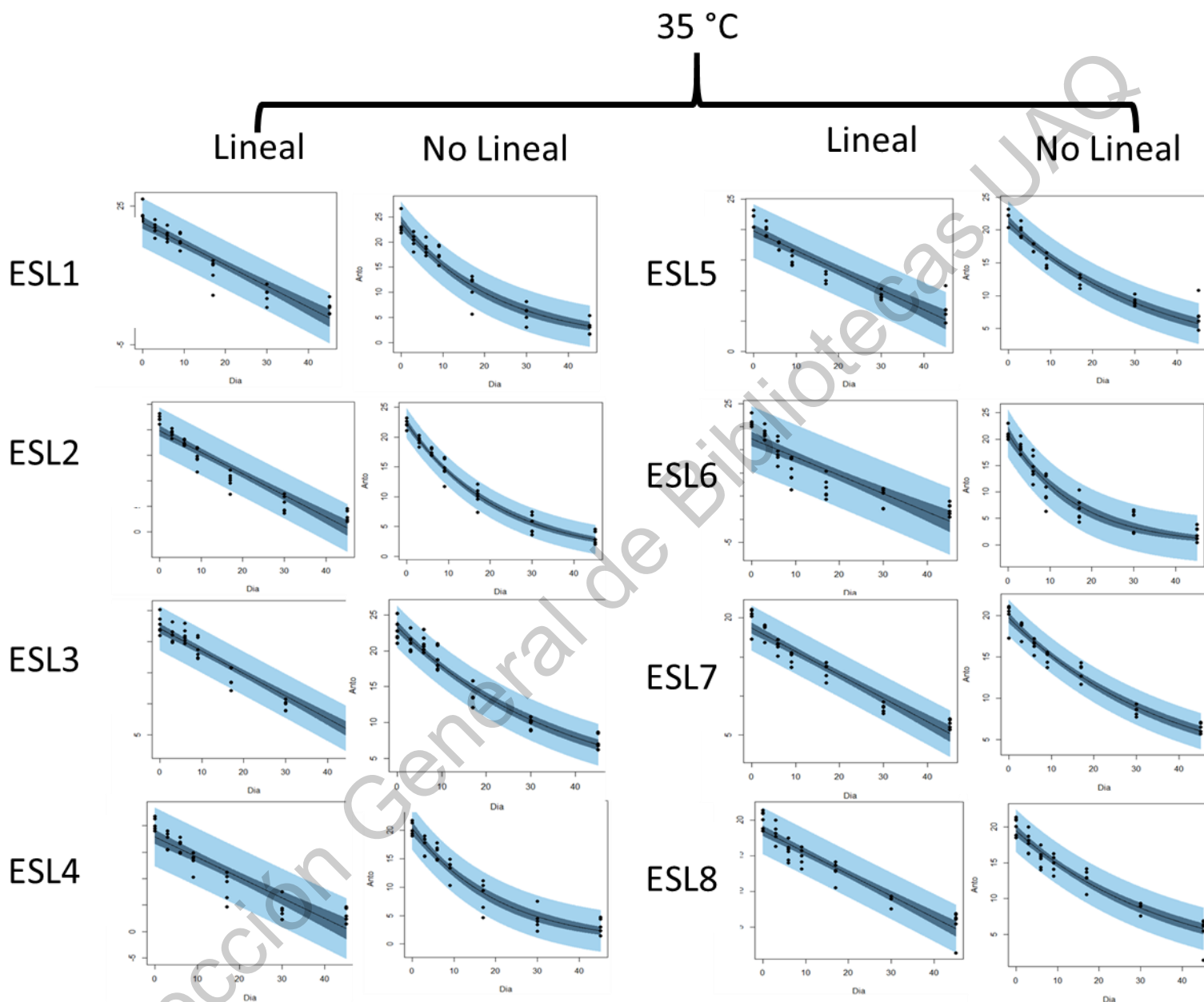
Anexo 5. Cinéticas de degradación de pigmentos de jamaica almacenadas durante 45 días a 4 °C, modeladas con ecuaciones lineales y no lineales.



Anexo 6. Cinéticas de degradación de pigmentos de jamaica almacenadas durante 45 días a 25 °C, modeladas con ecuaciones lineales y no lineales.

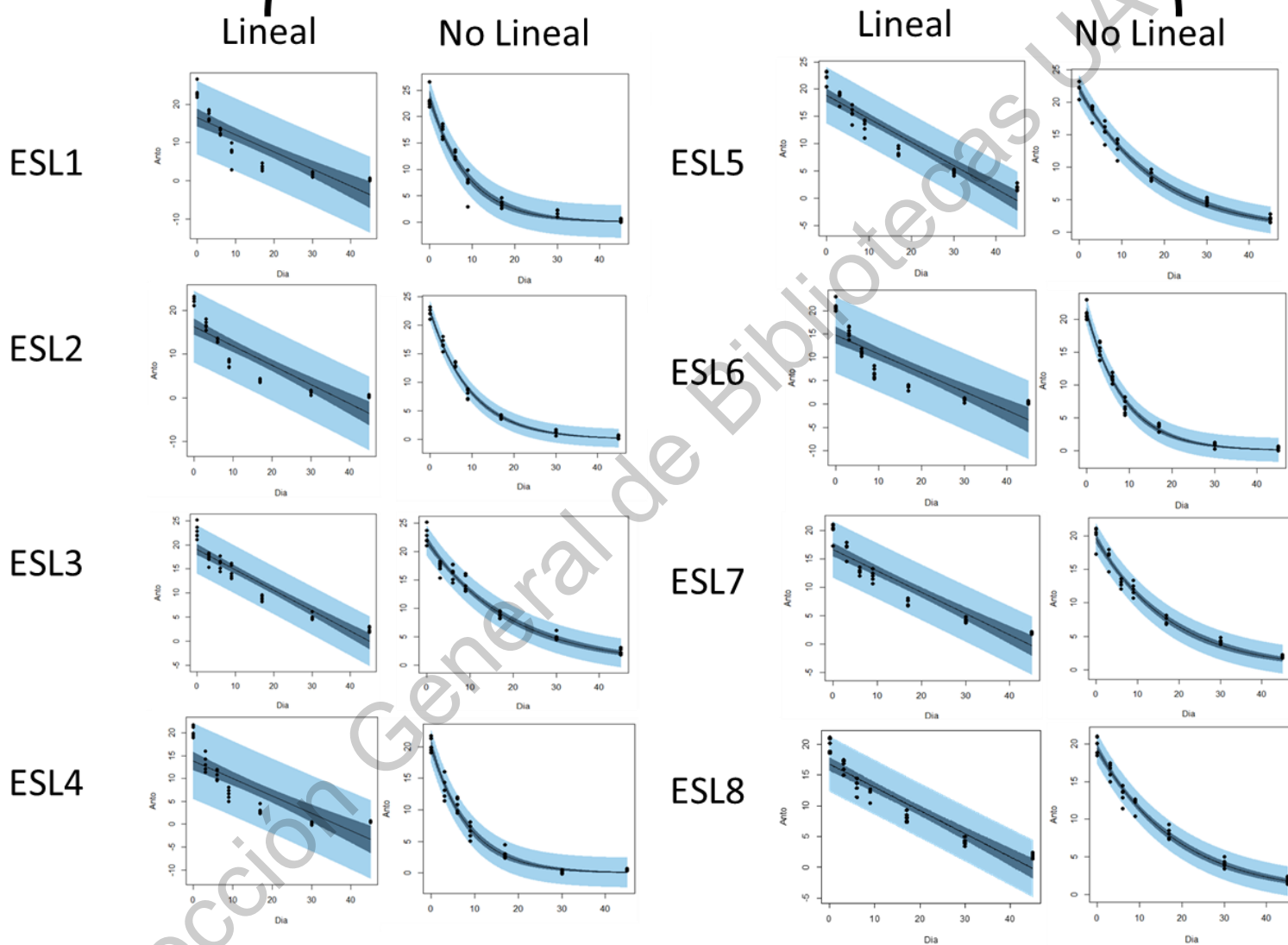


Anexo 7. Cinéticas de degradación de pigmentos de jamaica almacenadas durante 45 días a 35 °C, modeladas con ecuaciones lineales y no lineales.



Anexo 8. Cinéticas de degradación de pigmentos de jamaica almacenadas durante 45 días a 45 °C, modeladas con ecuaciones lineales y no lineales

45 °C



Anexo 9. Cinéticas de degradación de pigmentos de jamaica almacenadas durante 8 horas a 80 °C, modeladas con ecuaciones lineales y no lineales.

