



00567  
1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**Antocianinas de la Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa sabdariffa*). Extracción, Aislamiento,  
Caracterización y Estabilidad.**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

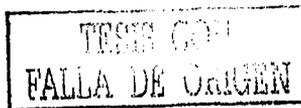
PRESENTA

LILIANA ANCHONDO ESPINOSA



**Ciencias  
Químicas**

TUTOR: FRANCISCA AIDA ITURBE CHIÑAS



AÑO: 2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

**PAGINACION**

**DISCONTINUA**

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, por mi formación y por brindarme la oportunidad de realizar los estudios de posgrado en el extranjero.

A la Escuela de Biosciencias Alimentarias de la Universidad de Reading, Inglaterra, por su hospitalidad y por las grandes enseñanzas que me dejó.

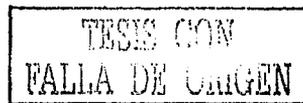
A la Unión Europea (ALFA Programme) por el gran apoyo económico brindado.

A la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de México, UNAM, por el generoso complemento económico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT por otorgarme apoyo económico durante la realización de la Maestría.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado por otorgarme la beca de Posgrado.

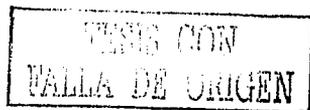
Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo receptor  
NOMBRE: LILIANA ANCHONDO ESPINOSA  
FECHA: 2 JUNIO 2003  
FIRMA: [Firma]



***A mis padres, por ese gran ejemplo***

**Sitio donde se desarrolló el tema: Lab. 424, School of Food Biosciences, The  
University of Reading, England y  
Lab. 323, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.**

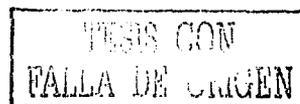
C



# INDICE

## CONTENIDO

|   |     |
|---|-----|
| Indice  | i   |
| Resumen   | iii |
| Introducción  | 1   |
| Justificación   | 3   |
| 1.0 Antecedentes  | 3   |
| 1.1 Origen, Usos y Fisiología de <i>Hibiscus sabdariffa</i> | 3   |
| 1.2 Pigmento de <i>Hibiscus sabdariffa</i> : ANTOCIANINAS   | 4   |
| 1.2.1 Estabilidad   | 6   |
| 1.2.1.1 Efectos Estructurales en la Molécula                | 8   |
| 1.2.2 Estabilización del Color                              | 9   |
| 1.3 Componentes de <i>Hibiscus sabdariffa</i>               | 11  |
| 1.3.1 Azúcares  | 11  |
| 1.3.2 Polisacáridos   | 11  |
| 1.3.3 Proteínas   | 12  |
| 1.3.4 Acidos Orgánicos                                      | 12  |
| 2.0 Objetivos   | 12  |
| 2.1 Objetivo General del Proyecto                           | 12  |
| 2.2 Objetivos Específicos de la Investigación               | 12  |
| 3.0 Materiales y Métodos                                    | 13  |
| 3.1 Materiales  | 13  |
| 3.2 Métodos   | 13  |
| 3.2.1 Selección del Método de Extracción                    | 14  |
| 3.2.2 Aislamiento   | 14  |
| 3.2.2.1 Cromatografía en Capa Fina (TLC)                    | 14  |
| 3.2.3 Caracterización                                       | 15  |
| 3.2.3.1 Análisis de Absorción UV/Visible                    | 15  |
| 3.2.3.2 Hidrólisis  | 15  |
| 3.2.3.3 Identificación de Agliconas                         | 15  |
| 3.2.3.3.1 Análisis por Cromatografía en Capa Fina (TLC)     | 15  |
| 3.2.3.3.2 Análisis por HPLC                                 | 15  |
| 3.2.3.4 Identificación de Azúcares                          | 16  |
| 3.2.3.4.1 Análisis por TLC                                  | 16  |
| 3.2.3.4.2 Análisis por Cromatografía de Gases (GC)          | 16  |
| 3.2.4 Estabilidad de Color                                  | 17  |
| 3.2.4.1 Preparación de Soluciones. Análisis UV-Vis          | 17  |
| 3.2.4.2 Análisis Sensorial                                  | 17  |
| 3.2.4.2.1 Selección y Entrenamiento de Panelistas           | 17  |
| 3.2.4.2.2 Condiciones Generales para el Análisis            | 17  |
| 3.2.4.2.3 Preparación de las Muestras                       | 17  |
| 3.2.4.2.4 Diseño Experimental                               | 18  |
| 3.2.4.2.5 Presentación de las Muestras y Evaluación         | 18  |
| 3.2.4.2.6 Análisis de Datos                                 | 18  |



|                  |  |           |
|------------------|--|-----------|
| <b>3.25</b>      | <b>Estabilización de Color</b>         | <b>19</b> |
| <b>3.25.1</b>    | <b>Co-pigmentación</b>                 | <b>19</b> |
| <b>3.25.1.1</b>  | <b>Análisis UV-Visible</b>             | <b>19</b> |
| <b>3.25.1.2</b>  | <b>Análisis Colorimétrico</b>          | <b>19</b> |
| <b>4.0</b>       | <b>Resultados y Discusión</b>          | <b>20</b> |
| <b>4.1</b>       | <b>Extracción. Análisis UV-Visible</b> | <b>20</b> |
| <b>4.2</b>       | <b>Aislamiento</b>                     | <b>23</b> |
| <b>4.3</b>       | <b>Caracterización</b>                 | <b>23</b> |
| <b>4.3.1</b>     | <b>Identificación de Agliconas</b>     | <b>23</b> |
| <b>4.3.2</b>     | <b>Identificación de Azúcares</b>      | <b>25</b> |
| <b>4.4</b>       | <b>Cuantificación</b>                  | <b>27</b> |
| <b>4.4.1</b>     | <b>Agliconas</b>                       | <b>27</b> |
| <b>4.4.2</b>     | <b>Azúcares</b>                        | <b>27</b> |
| <b>4.5</b>       | <b>Estabilidad de Color</b>            | <b>28</b> |
| <b>4.5.1</b>     | <b>Análisis Colorimétrico</b>          | <b>28</b> |
| <b>4.5.2</b>     | <b>Análisis Sensorial</b>              | <b>34</b> |
| <b>4.6</b>       | <b>Estabilización de Color</b>         | <b>39</b> |
| <b>5.0</b>       | <b>Conclusiones</b>                    | <b>44</b> |
| <b>6.0</b>       | <b>Trabajo Futuro</b>                  | <b>44</b> |
| <b>7.0</b>       | <b>Referencias</b>                     | <b>45</b> |
| <b>ANEXO I</b>   |  | <b>50</b> |
| <b>ANEXO II</b>  |  | <b>59</b> |
| <b>ANEXO III</b> |  | <b>60</b> |

## RESUMEN

El uso de pigmentos de la flor de Jamaica en el campo de alimentos, promete alternativas potencialmente superiores a las actuales en aspectos importantes; por ejemplo la inocuidad. El consumo de colorantes sintéticos, se ha venido cuestionando a la luz de estudios de tolerancia y toxicidad sobre aditivos. La ventaja de los colorantes sintéticos, hasta el momento, ha sido su estabilidad. Sin embargo, hay un interés creciente en desarrollar aditivos inocuos, metabolizables y biodegradables. Las antocianinas, siendo productos naturalmente coloridos han sido foco obvio de atención, y en ese respecto, numerosos estudios han sido dirigidos a elucidar mecanismos para la estabilización e intensificación del color, ya que, en contraste con aditivos sintéticos, el color de las especies antocianicas en su mayoría es inestable cuando se encuentran fuera de sus condiciones naturales.

De esta manera, los objetivos específicos de la investigación fueron seleccionar un método óptimo de extracción de antocianinas, caracterizar y cuantificar a las antocianinas presentes en la flor de jamaica y por último, estudiar la estabilidad del color en el extracto y sus respectivas repercusiones sensoriales.

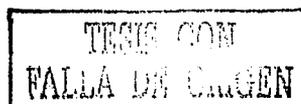
El desarrollo del proyecto se propuso en dos fases integrales: 1) Extracción, aislamiento e identificación de los pigmentos y 2) Estudios de estabilidad de color y su repercusión en la percepción sensorial. En la primera fase se utilizaron principalmente técnicas cromatográficas (TLC, HPLC y GC) y espectrofotométricas (región UV-Vis), apoyadas por análisis químicos de las estructuras coloridas. Para la segunda fase fue necesario utilizar tanto métodos colorimétricos (sistema CIELAB) como espectrofotométricos (región visible) y algunas técnicas sensoriales (comparaciones pareadas y QDA).

El mayor rendimiento de pigmento que se obtuvo fue utilizando metanol a 65°C por 15 minutos. Las antocianidinas aisladas fueron identificadas como cianidina y delphinidina. Los azúcares presentes en ambas antocianidinas fueron identificados como xilosa y glucosa. El contenido de éstos sugiere que los pigmentos son diglicósidos de cianidina y delphinidina conformados por una molécula de xilosa y otra de glucosa.

El rendimiento total del pigmento fue de 1.2 % (masa/masa) del cual el 41% corresponde a cianidina y el 59% a delphinidina.

Estudiando la estabilidad de las antocianinas, se observó que soluciones concentradas presentaban el fenómeno de incrementar el color hasta un 58% a temperatura ambiente. Bajo las condiciones probadas, el máximo aumento de color se dio después de 12 horas de incubación. Es probable que este incremento de color sea la consecuencia de un fenómeno conocido como auto-asociación.

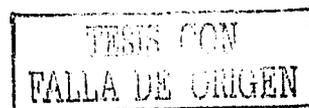
No se detectó diferencia perceptible en la apariencia, sabor y resabio de una solución de jamaica diluida 58% con respecto a la original (no diluida). Sin embargo, se detectó diferencia significativa en el aroma, específicamente en la frutalidad y la nota a té.



# INTRODUCCION

La flor de jamaica es un producto de abundancia nacional; es cultivada, recogida y posteriormente sometida a secado. El proceso es mayormente tradicional y se realiza en el sur del país, normalmente por comunidades campesinas. El producto seco es adquirido por almacenadores y posteriormente es distribuido en mercados y vendido al público. Dada la presencia de azúcares en la materia prima y el tratamiento tradicional de secado, el producto presenta variabilidad en la coloración de los cálices, posiblemente asociada con la humedad del producto final y con reacciones no enzimáticas de oscurecimiento durante el secado/transporte. La vida en anaquel del producto parece ser larga a pesar del alto contenido residual de humedad que alcanza.

El incentivo para este trabajo está dado por el gran potencial de la flor de jamaica como ingrediente funcional y como pigmento con posible mercado en campos diversos: alimentos, colorantes y pigmentos industriales (Camire, 2002). Los componentes relevantes reportados son glicósidos de cianidina y de delphinidina (Du y Francis, 1973; Pouget, 1990), y sus estructuras absorben radiación en el intervalo del espectro electromagnético de 360-700 nm que los hace perceptibles a través de su color (Esselen y Sammy, 1973; Clydesdale et al., 1987; Francis, 1984). Estos compuestos pertenecen al grupo conocido genéricamente como antocianinas, y son parte de la familia de los flavonoides (Timberlake, 1975). Las antocianinas son extremadamente abundantes en la naturaleza, de conocida inocuidad e imparten colores vívidos a flores y frutos de los vegetales, así como a otras manifestaciones del reino vegetal (semillas, raíces, etc.) (Brouillard, 1983; Harborne, 1965; Harborne, 1967; Lev-Yadun, 2001;). El color está determinado por la conformación y equilibrio de las estructuras antocianicas y puede ser realzado o disminuido por la presencia de otras especies químicas (Markakis, 1974; Francis, 1977, Hrazdina, 1974; Archetti, 2000; Alarcão-E-Silva, et al., 2001; Taylor y Feild, 2001). El equilibrio químico está en función del pH, complejaciones intracelulares, autoasociaciones y presencia de oxidantes (luz, oxígeno, sulfitos, ácido ascórbico) (Timberlake, 1980; Kanehira y Saito, 2001; Gómez-Plaza, et al., 2002). Para un adecuado monitoreo de las afecciones en el color, se deben tomar en cuenta no solo mediciones espectrofotométricas, sino colorimétricas, ya que el color es un fenómeno fisicosensorial. En lo que respecta a espectrofotometría, es necesario considerar no solo la longitud máxima en el espectro visible, sino toda la curva espectral de absorción. Colorimétricamente, se debe realizar una descripción del color basado en tres atributos: tono (croma), saturación (pureza) y brillantez (sensación de oscuridad o luminosidad) bajo una o varias fuentes de luz (Gonnet, 1998; Sears, 1960; McDougall, 1988).



El valor nutricional de la flor de jamaica radica en su contenido de antioxidantes como el ácido ascórbico y las antocianinas mismas (Ibrahim, 1971; Hyomi, 1992). Su uso popular como bebida provee al consumidor de esos nutrientes, así como de minerales. Su éxito, sin embargo, radica en las notas sensoriales que evoca en el consumidor: sensaciones gustatorias de frescura, agradable acidez y astringencia acompañadas de notas aromáticas frutales y de caramelo. A esto debe añadirse el efecto visual, dado por el atractivo color, que va de un rosa azulado a un carmín oscuro, dependiendo de la preparación del producto y la concentración de pigmentos en la infusión, la cual se consume usualmente con azúcar y en frío.

La contribución de los pigmentos antociánicos a la sensación gustatoria, no parece ser considerada en la literatura excepto en estudios de Enología y Viticultura, donde la contribución de las antocianinas al sabor de vinos, especialmente los añejados, se atribuye a complejaciones de los productos de degradación de estos pigmentos con los polifenoles (procianidinas) de la uva y a reacciones aún más complejas (Fernández-López et al., 1992; Gómez-Plaza et al., 2002;). El caso particular de la flor de jamaica puede ser un modelo dada su composición relativamente simple, para estudiar la posible interacción de estructuras antociánicas en solución y su contribución individual/combinada a sensaciones gustatorias.

El uso de pigmentos de la flor de jamaica en el campo de alimentos, promete mejores alternativas que las actuales, no sólo por la inocuidad de estas especies, sino por beneficios potenciales a la salud (Peterson y Dwyer, 2000; Agewall et al., 2000). El consumo de colorantes sintéticos, se ha venido cuestionando a la luz de estudios de tolerancia y toxicidad de los aditivos (Lancrenon, 1978; Meggos, 1984, Francis, 1984). La ventaja de los colorantes sintéticos hasta el momento ha sido su estabilidad. Por lo tanto hay un interés creciente en desarrollar aditivos inocuos, metabolizables y biodegradables (Camire, 2002). Las antocianinas, siendo colorantes naturales han sido foco obvio de atención, lo que ha motivado a la realización de estudios dirigidos a elucidar mecanismos para la estabilización e intensificación del color (Gómez-Plaza et al., 2002; Kanehira y Saito, 2001), ya que en contraste con los aditivos sintéticos, el color de las especies antociánicas es inestable cuando estas sustancias son colocadas en condiciones diferentes a las de la naturaleza.

# JUSTIFICACION

Las investigaciones basadas en este producto natural se consideran oportunas y potencialmente muy provechosa desde un número de perspectivas:

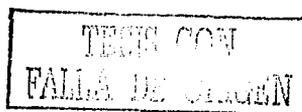
- Contribuir al avance del conocimiento en la química de estos compuestos de abundancia nacional y cuya industrialización acarrearía beneficios económicos.
- Dar oportunidad de practicar ciencia básica y ejercitar sus aplicaciones.
- Considerar con base en lo anterior, la mayor utilización y el mejor aprovechamiento de la flor de jamaica en diversos campos como: saborizante, colorante alimenticio, pigmento funcional y en general como un ingrediente con usos múltiples.

El proyecto se desarrolló en dos fases integrales: 1)Extracción, aislamiento e identificación de los pigmentos y 2)Estudios de estabilidad de color y su repercusión en la percepción sensorial.

## 1.0 ANTECEDENTES

### 1.1 Origen, Usos y Fisiología de *Hibiscus sabdariffa*

*Hibiscus sabdariffa*, también conocida como roselle, flor de jamaica o karkade, es una planta perteneciente a la familia *Malvaceae*. La Flor de jamaica es probablemente nativa del oeste de Africa y se presenta en dos variedades: *H. sabdariffa altissima*, cultivada por el contenido de fibra de sus tallos y *H. sabdariffa sabdariffa* cultivada por la porción externa de sus flores (cálices). Aunque la planta es perenne, la flor de jamaica es principalmente un cultivo anual y se propaga a partir de sus semillas. Crece mejor en condiciones húmedas, principalmente en climas tropicales. Requiere un promedio de lluvia de 25 cm al mes en la temporada de producción. La planta mide 0.5-3.0 metros de altura. Las ramas son verticales, paralelas al tallo. Las flores tienen normalmente cinco pétalos amarillo crema que rápidamente se transformarán en rojos. En lugares tropicales, los cálices rojos de *H. sabdariffa* se utilizan para preparar bebidas, salsas, conservas, jaleas y como colorante alimentario (Beattie,1937; Crane,1949; Esselen y Sammy,1973). Adicionalmente, la fibra del tallo de *Hibiscus sabdariffa altissima* se ha utilizado para manufactura de ropa, sábanas y redes de pesca (Beattie,1937). Las hojas también son usadas en ensaladas y las semillas como fuente de aceite (Clydesdale et al.,1978).



Wester (1911) sugiere que el uso culinario de las flores fue primeramente reconocido en Jamaica y es de ahí probablemente de donde viene su nombre.

Los cálices de la flor de jamaica, tienen una considerable cantidad de compuestos fenólicos, principalmente antocianinas, las cuales son las responsables de su brillante color rojo. Du y Francis (1973) fueron los primeros en investigar la composición de los pigmentos de la flor y encontraron xilosilglucósidos de cianidina y delphinidina, en un contenido total de 1.5 g de ambas antocianinas por 100 g de cálices secas. Dada su abundancia natural, empezó el interés en el potencial de la flor de jamaica como colorante natural. Sin embargo, los colorantes naturales de tipo antociánico presentan problemas respecto a su estabilidad ya que el color se deteriora cuando están fuera de su ambiente natural (ejemplos clásicos están dados por las fresas, cerezas y ciruelas procesadas).

Las antocianinas pueden ser afectadas por factores como luz, pH, temperatura u oxígeno (Markakis, 1974; Francis, 1977; Hrazdina y Franzese, 1974). Así, la investigación en esta área se ha enfocado a un mejor entendimiento de la química de las antocianinas y los mecanismos mediante los cuales el color puede ser preservado o mejorado (Mazza y Miniati, 1993).

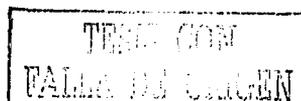
Esselen and Sammy (1973) reportaron que las curvas espectrofotométricas del extracto de flor de jamaica son muy similares a las curvas dadas por el colorante artificial No. 2 (Amaranto), esto es debido a la proporción de los derivados de cianidina y delphinidina presentes en la flor (Du y Francis, 1973).

A pesar de la amplia utilización, reportes en la literatura indican una limitada investigación de los pigmentos de la flor de jamaica. Así el enfoque principal de este trabajo es profundizar en los mecanismos de estabilización de las estructuras coloridas (antocianinas).

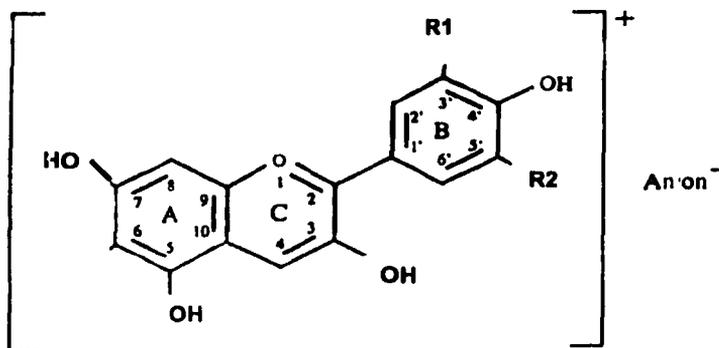
La flor de jamaica podría proveer materia prima (en polvo o solución) para la elaboración de nuevas formulaciones alimentarias y otros tipos de productos en diversas áreas donde el color juegue un papel importante (cosmetología, farmacología y pigmentos industriales).

## 1.2 Pigmentos de *Hibiscus sabdariffa*: ANTOCIANINAS

Como ya se mencionó anteriormente, el intenso color rojo de la flor de jamaica se debe a su alto contenido de antocianinas. Las antocianinas son glicósidos de antocianidinas solubles en agua y forman parte de los compuestos fenólicos con esqueleto de 15 carbonos comúnmente conocidos como flavonoides. Las antocianinas se encuentran en casi todas las plantas superiores, en las que ocurren en muchas formas, pero generalmente son representadas como cationes flavilo (antocianidinas) asociados con aniones, quizás porque fueron primeramente aisladas como cloruros en soluciones fuertemente ácidas (Timberlake, 1980). Sus estructuras pueden ser clasificadas en primaria, secundaria y terciaria. El catión flavilo o antocianidina es conocido como estructura primaria.



Las seis estructuras primarias o antocianidinas más comunes son pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina. El esqueleto antocianico y el patrón de sustitución para las estructuras primarias más frecuente es mostrado en la Figura 1.



| Compuesto     | R1               | R2               |
|---------------|------------------|------------------|
| Delphinidina  | OH               | OH               |
| Cianidina     | OH               | H                |
| Petunidina    | OCH <sub>3</sub> | OH               |
| Pelargonidina | H                | H                |
| Peonidina     | OCH <sub>3</sub> | H                |
| Malvidina     | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> |

**Figura. 1 Estructuras de las Seis Antocianidinas más Comunes**

Los glicósidos de antocianidinas son considerados estructuras secundarias y las más comunes son 3-monósidos, 3-biósidios y 3-triósidios, también se conocen 3,5-diglicósidos y no tan frecuentemente los 3,7-diglicósidos. Los azúcares que se encuentran más comúnmente formando uniones glicosídicas en estos compuestos son glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa y xilosa.

Las estructuras terciarias son aquéllas que presentan grupos acilo unidos normalmente a los azúcares. Los grupos acilo más comunes son ácidos fenólicos de los cuales los ácidos hidroxicinámicos como cumárico, caféico y ferúlico son los más comunes, y más raramente los ácidos hidroxibenzoicos (Harborne y Dey, 1989).

Pouget y sus colaboradores (1990) investigaron las principales antocianinas presentes en la flor de jamaica. Ellos encontraron al igual de Du y Francis en 1973, glicósidos de cianidina y delphinidina como pigmentos mayoritarios en la flor.

### 1.2.1 Estabilidad

Las modificaciones estructurales de las antocianinas en soluciones acuosas, son debidas a la alta reactividad del esqueleto básico o aglicona. Las antocianinas genuinas están libres de aniones y normalmente son representadas por su base quinoidal. La Figura 2 muestra las transformaciones estructurales de las antocianinas, las cuales han sido clarificadas por Brouillard y Dubois (1977) y Brouillard y Delaporte (1978). La protonación de la base quinoidal de color azul, da como resultado el catión flavilo de color rojo ( $AH^+$ ), el cual puede hidratarse para dar especies no coloridas como la pseudo-base carbinol, la cual existe o puede existir en equilibrio tautomérico con su pseudo-base chalcona formada por la apertura del anillo heterocíclico, también sin color. La distribución en el medio de estas cuatro estructuras, depende completamente de los cambios en el pH. En soluciones fuertemente ácidas ( $pH < 0.5$ ), el catión flavilo es la única especie en existencia. A medida que incrementa el pH, la concentración del catión, y por lo tanto el color rojo, decrece mientras la concentración de la pseudo-base carbinol aumenta; el equilibrio entre estas dos formas se caracteriza por un valor de  $pK$  de 2.5 cuando cantidades equivalentes de las estructuras están coexistiendo. A pH de 2.5, empieza a formarse un poco de pseudo-base chalcona y de base quinoidal que seguirán formándose a medida que siga incrementando el valor de pH; entre pH 4 and 5 queda muy poco color en las antocianinas porque la cantidad de las formas coloridas (catión y base quinoidal) son muy pequeñas; entre pH 5 y 6 existe muy poca cantidad de base quinoidal azul la cual es la única forma colorida presente en el medio. La Figura 3 representa el equilibrio de 3-O-glucopiranosil malvidina a diferentes pH

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

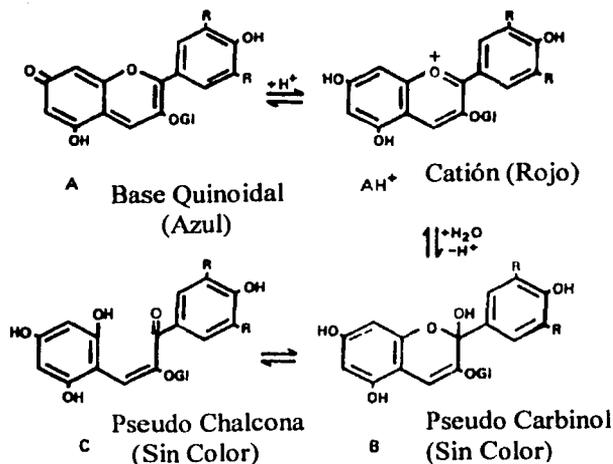


Figura.2 Transformaciones Estructurales de las Antocianinas en Función del pH. (Brouillard y Delaporte, 1977).

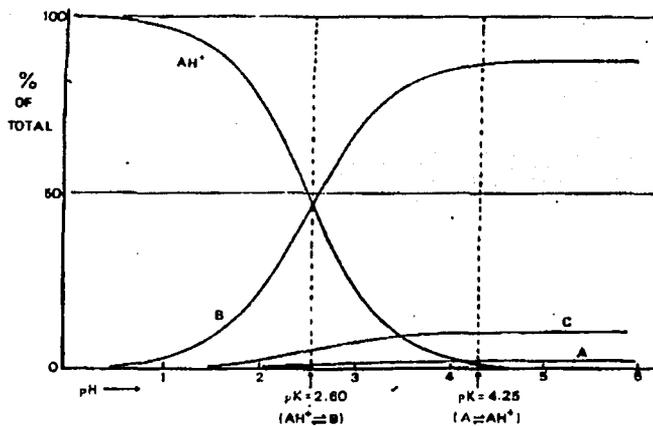


Figura.3 Distribución Estructural de 3-O-glucopiranosil Malvidina a 25°C en Función del pH. AH<sup>+</sup>= Cación Flavilo; B=Pseudo-base carbinol; C=Pseudo-base chalcona; A=Base quinoidal. (Timberlake, 1980)

## Efectos Estructurales de la Molécula

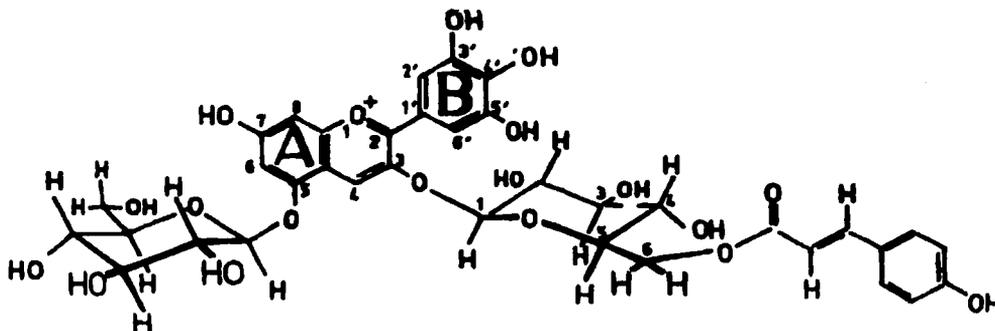
Lo que generalmente se mide para conocer la estabilidad estructural de las antocianinas, es la suma de las tres constantes de equilibrio (Figura 2) que corresponde a la transformación global. Es obvio que los cambios en el equilibrio global ocasionados por las transformaciones estructurales, surgen de los cambios simultáneos de los tres equilibrios debido a que la influencia de un sustituyente dado es necesariamente diferente en una reacción y en otra. Hasta nuestros días, aún no es posible saber satisfactoriamente qué elementos estructurales tienen mayor influencia sobre los equilibrios de la Figura 2.

Se sabe que la deslocalización de la carga positiva sobre todo el sistema flavilo es el factor determinante para el equilibrio ácido-base.

En general, la estabilidad de las antocianinas ocurre en el siguiente orden:

3,5- dimonósido > 5-monósido > 3-monósido > aglicona

Un ejemplo muy estudiado de una antocianina estable de ocurrencia natural es la 3-(6-*O-trans-p*-cumaroil- $\beta$ -D-glucósido)-5- $\beta$ -D-glucósido de delphinidina, conocida comúnmente como awobanina. Su estructura fue determinada por RMN- $^1\text{H}$  (Brouillard, 1982):



## 1.2.2 Estabilización del Color

Existen muchas publicaciones (Robinson y Robinson, 1931; Timberlake y Bridle, 1975; Asen, 1976; Brouillard, 1982; Mazza y Miniati, 1993 y las referencias contenidas; Gonnet, 1998 y las referencias contenidas) que muestran que el color de las antocianinas puras es afectado por el patrón de hidroxilación, metilación, glicosilación y acilación de la molécula, además del pH del medio en donde son disueltas, como ya se había mencionado antes. De esta manera, una misma antocianina puede mostrar diferentes colores en diferentes flores, así como también diferentes antocianinas pueden manifestar la misma coloración en diferentes tejidos (Robinson y Robinson, 1931). De igual forma, una antocianina presente en un tejido específico que imparte una coloración intensa y brillante, puede decolorarse al ser extraída de su ambiente natural a pesar de disolverla a un pH igual que el de la célula en donde se encontraba (Timberlake y Bridle, 1975; Asen, 1976).

De acuerdo con lo anterior, parecería que las antocianinas tienen un futuro muy limitado como colorante alimentario debido a su gran inestabilidad. Sin embargo, hay mecanismos mediante los cuales las estructuras coloridas pueden ser estabilizadas, de tal manera que manteniendo condiciones adecuadas, es todavía posible tener una cantidad considerable de color, aún con un intervalo más amplio de pH.

El primer mecanismo es la "autoasociación" de la forma catiónica, donde las antocianinas interaccionan con ellas mismas y con otros compuestos presentes ocasionando un incremento en el color más de lo que proporcionalmente correspondería a su concentración.

El segundo, es la llamada "co-pigmentación". Este mecanismo puede ser definido como el fenómeno que hace al color de las antocianinas más intenso, más brillante y más estable debido a la interacción de las antocianinas con compuestos orgánicos. Esto ocurre cuando un co-pigmento es agregado a una solución acuosa de antocianinas, ligeramente ácida y suficientemente concentrada; entonces producirá un incremento en la intensidad de color y un cambio en el tono el cual es designado como "efecto azulante" (desplazamiento batocrómico) o bien, cuando un co-pigmento está naturalmente presente en las células de las plantas. Con la ayuda de la espectrofotometría de absorción UV-Vis, se ha observado que la presencia de un co-pigmento generalmente produce un incremento en la absorción visible (efecto hiperocrómico) y que la longitud de onda de máxima absorción se desplaza hacia longitudes de onda más altas (efecto batocrómico). Existe una gran variedad de moléculas que pueden actuar como co-pigmentos, tales como flavonoides, polifenoles, alcaloides, amino ácidos, ácidos orgánicos y las mismas antocianinas.

Flavonoides no coloridos y polifenoles son frecuentemente encontrados en asociación con antocianinas dentro de la vacuola de las células coloridas de órganos de plantas superiores. Así, el fenómeno de copigmentación está

abundantemente presente en la naturaleza. También ocurre en frutas y productos vegetales tales como jugos o vinos.

La intensidad en el efecto de co-pigmentación es dependiente de muchos factores como concentración de antocianina y de co-pigmento, estructuras químicas, el pH del medio, el disolvente y la temperatura. La magnitud del efecto del co-pigmento, a una proporción dada de antocianina:co-pigmento, en solución acuosa amortiguada y a temperatura ambiente, es generalmente estimada por el incremento en absorbancia a una longitud de onda máxima de absorción. También el incremento en el valor de la longitud de onda máxima, puede ser observada.

A nivel molecular, pueden ocurrir dos tipos de co-pigmentación: Intramolecular e Intermolecular. Se cree que la co-pigmentación intramolecular es más eficiente que la co-pigmentación intermolecular (Brouillard, 1982).

También existen otros mecanismos de co-pigmentación como la complejación con metales y algunas condensaciones con flavanoles (Escribano-Bailón et al., 2001).

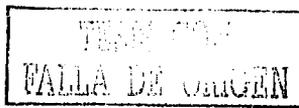
**Co-pigmentación intramolecular.** Este fenómeno es responsable de la extraordinaria estabilidad de los cromóforos de antocianinas poliaciladas. Los residuos aromáticos de los grupos acilos se apilan con el anillo pirilo del catión flavilo, provocando así la protección de la estructura contra la adición de agua en los carbonos 2 y 4 de la molécula. Las reacciones de hidratación son por lo tanto reducidas y como las reacciones de transferencia de protones no son aparentemente afectadas por el proceso de apilamiento, la estabilidad de los cromóforos incrementa considerablemente.

**Co-pigmentación intermolecular.** Este mecanismo está dado por interacciones débiles entre moléculas orgánicas (co-pigmentos) y antocianinas (pigmentos), que modifican el color y la estabilidad de éstas (Osawa, 1982). Este efecto produce un desplazamiento batocrómico en la longitud de onda máxima de absorción visible. La efectividad de un co-pigmento está relacionada con la extensión del ya mencionado desplazamiento batocrómico y en el incremento de la absorción (Brouillard, 1983; Mazza y Brouillard, 1990).

La reacción de formación del complejo antocianina-co-pigmento compite con la reacción de hidratación de la antocianina y la hidratación del complejo formado no ocurrirá en absoluto.

Se ha propuesto que la estructura del complejo consiste de un apilamiento vertical de la antocianina con el co-pigmento mediante interacciones de tipo hidrofóbico.

La completa descripción de los efectos sobre el color durante la co-pigmentación no ha sido tomada en cuenta del todo. De acuerdo con el Comité de Colorimetría, no es estrictamente correcto atribuir color a un objeto, sino la luz que éste refleja. Esto, por supuesto, dependerá de la luz incidente y en la manera en



que el color es afectado durante su reflexión, ya que los objetos no reflejan todo el espectro, hay una reflexión selectiva que está en función de la longitud de onda.

Así, cuando el color es medido a una cierta longitud de onda mediante espectrofotometría, en realidad se está midiendo la fracción de luz incidente que el objeto refleja y por lo tanto el color reflejado dependerá del color de la luz iluminante.

### 1.3 Componentes de la Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)

La composición general de la flor de jamaica se muestra en la Tabla I.

**Tabla I. Composición de la Flor de jamaica originaria de diferentes áreas**

| Muestra   | Humedad | Sólidos, Insolub. | Proteína | Grasa | Acido Máltico | Acido Benzoí | Azúcares reduc. | Sacarosa | Fibra | Cenizas |
|-----------|---------|-------------------|----------|-------|---------------|--------------|-----------------|----------|-------|---------|
|           | %       | %                 | %        | %     | %             | %            | %               | %        | %     | %       |
| Americana | 88.91   | 6.67              | a        | a     | 2.77          | 0.00         | 0.33            | 0.03     | A     | 0.89    |
| Filipina  | 82.49   | 7.39              | a        | a     | 3.31          | 0.00         | 0.82            | 0.41     | A     | 1.26    |
| Hawaiana  | 88.42   | 5.03              | 1.23     | 0.82  | 3.11          | a            | 0.20            | 0.00     | 1.45  | 0.65    |

Fuente: Winton y Winton (1935).

a=no determinado

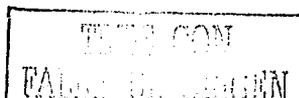
#### 1.3.1 Azúcares

En general la flor contiene bajos niveles de sacarosa comparados con los de azúcares reductores (Siliha y Askar, 1987).

La composición de azúcares analizada por HPLC para la variedad Filipina, muestra 0.45% sacarosa, 1.32% glucosa y 1.34% fructosa; no se encontró xylosa libre en la flor de jamaica.

#### 1.3.2 Polisacáridos

Algunos polisacáridos hidrosolubles han sido aislados de la flor de jamaica (Mueller y Franz, 1992). Dos de estos polisacáridos son neutros y formados por arabinanas y arabinogalactanas de peso molecular relativamente bajo. La fracción mayoritaria es una molécula parecida al tipo pectínico, en donde la cadena principal está compuesta de enlaces  $\alpha$ -1,4-galactosa (24% metil eterificada) y  $\alpha$ -1,2-ramnosa. Las cadenas laterales son de galactosa y arabinosa conectadas a la cadena principal via C-4 de cada tres ramnosas. Esta estructura parece diferir de los polisacáridos de otras especies de el género *Hibiscus* y de la familia *Malvaceae*.



### 1.3.3 Proteínas

Información publicada indica la presencia de aminoácidos en la flor de jamaica, de los cuales 9 son esenciales (Ibrahim et al., 1971); sin embargo, la identidad de éstos no fue reportada.

### 1.3.4 Acidos Orgánicos

En 1971, Ibrahim y sus colaboradores reportaron la presencia de algunos ácidos orgánicos como málico, oxálico, ascórbico y cítrico. Se ha dicho que la acidez de las hojas y las flores es debida al contenido de ácido málico presente en la flor de jamaica (Esselen y Sammy, 1973)

Hyomi y Miura (1992), determinaron los componentes del aroma de *Hibiscus sabduriffa*, los cuales son usados como saborizante. Una gran cantidad de compuestos fueron identificados, incluyendo ácido benzóico, anisaldehído, levulinato de metilo, furfural y eugenol.

Aunque la acidez es la sensación predominantemente dada por los ácidos orgánicos, existen reportes de que la sensación de astringencia o sequedad también es dada por éstos (Lee y Lawless, 1991; Rubico y McDaniel, 1992). La astringencia de los ácidos es atribuida a la directa contribución de iones  $H^+$  o a la capacidad de los grupos hidroxilo de formar puentes de hidrógeno con los aniones o ácidos parcialmente disociados (Lawless et al., 1994).

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General del Proyecto

- Lograr un aprovechamiento integral de la flor de jamaica con especial interés en los pigmentos de la flor.

### 2.2 Objetivos Específicos de la Investigación

- Seleccionar un método óptimo de extracción para las antocianinas de la flor de jamaica.
- Caracterizar y cuantificar a las antocianinas presentes en la flor de jamaica.
- Estudiar la estabilidad del color en el extracto y sus repercusiones sensoriales.
- Estabilizar el color del extracto con respecto al pH, mediante mecanismos naturales como la co-pigmentación.

## 3.0 MATERIALES Y METODOS

### 3.1 Materiales

- Flor de jamaica cultivada y empacada en México (44 % humedad)
- Espectrofotómetro de absorción UV-Visible modelo Perkin-Elmer  $\lambda$  5.
- Colorímetro Hunter-lab ColorQuest Instrument.
- Placas de celulosa (Merck, U.K., 0.2 mm, 20 x 20 cm).
- Sistema autoanalizador de HPLC, Hewlett Packard Series 1050 con detección UV-Visible de arreglo de diodos, válvula de inyección con un rizo de 20  $\mu$ L. Columna pre-empacada de Kromasil (250 x 4mm), 5 $\mu$ m (Hichrom, Reading, U.K.)
- Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard 5890 Series II  
Columna capilar empacada con sílica 1  $\mu$ m, 30 m X 0.25 mm d.i., 14% cianopropilfenil y 86% copolímero de dimetilsiloxano, J&W DB-1701 (J&W Scientific, Inglaterra)
- Sistema de elusión para HPLC:  
Solución A: ácido fórmico-agua (5:95) y disolvente B: metanol, grado HPLC filtrados a través de un filtro millipore de 0.45  $\mu$ m
- Sistemas de elusión para TLC: 1) BAW: n-butanol- ácido acético-agua (4:1:5), fase superior, añejada tres días; 2) FORMICO: ácido fórmico-HCl<sub>conc.</sub>-agua (5:2:3); 3) FENOLICO: fenol-agua(4:1).
- Glucosa, galactosa, arabinosa, fructosa, xylosa, ácido clorogénico, ácido málico, cloruro de potasio, ftalato ácido de potasio e hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich, U.K.). Cloruro de cianidina y cloruro de delfinidina (Extrasynthese, Genay, France).
- Soluciones amortiguadoras: pH 1-2.2 KCl y HCl; pH 3 y 4.2 ftalato ácido de potasio y NaOH (Sigma Aldrich, U.K.).
- Reactivo revelador de azúcares: ácido *o*-ftálico (16.6g) y anilina (91 ml) disueltos en 1-butanol:éter etílico:agua (48:48:4 v/v) (Sigma Aldrich, U.K.)
- Reactivos para sililación: piridina, trimetilclorosilano (TMS), hexametildisilazano (HMDS) (Sigma Aldrich, U.K.)

### 3.2 Métodos

Durante la realización de todos los procedimientos experimentales, se evitó particularmente la presencia de luz y agentes oxidantes como oxígeno, mediante la protección de los materiales con papel aluminio y purgas frecuentes con N<sub>2</sub>.

### 3.2.1 Selección del Método de Extracción

Cantidades de flor de jamaica cultivada y empacada en México (44 % humedad) fueron extraídas en una relación de 1:10 con los siguientes disolventes: metanol, agua y etanol:agua (1:1 v/v). En cada mezcla se agregó 1% de ácido clorhídrico. Se investigaron dos condiciones de extracción: 24 horas a 4 °C y 15 minutos a temperatura de ebullición.

Con el objetivo de recuperar el máximo pigmento, se llevaron a cabo extracciones consecutivas para cada muestra y con el propósito de optimizar y realizar únicamente una extracción, se estudió el efecto del volumen de disolvente sobre el rendimiento en la extracción. Se probaron diferentes proporciones disolvente:soluto (10:1, 20:1 y 30:1 ). Cada extracto de Flor de jamaica (RE) (pigmentos y componentes solubles) fue analizado mediante un espectrofotómetro de absorción UV-Visible modelo Perkin-Elmer  $\lambda$  5.

El índice de degradación para los extractos alcohólicos y acuosos fue calculado por un método diferencial desarrollado por Fuleki y Francis (Markakis, et al, 1975), midiendo la absorbancia para los extractos a pH 1.0 (antocianinas intactas o casi intactas) y a pH 4.5 (antocianinas degradadas).

Los extractos de Flor de jamaica fueron preparados usando la masa de la flor (base seca) como materia prima. El contenido de sólidos para cada extracto fue calculado deduciendo la masa de agua después de liofilizar una alícuota de extracto. El contenido de pigmento fue calculado como cloruro de delfinidina ( $\log \epsilon = 4.4$ ).

### 3.2.2 Aislamiento

Una muestra de Flor de jamaica fue extraída con metanol acidificado en una proporción 1:10, a 65°C (ebullición) por 15 minutos (en oscuridad).

#### 3.2.2.1 Cromatografía en capa fina (TLC)

A placas de vidrio recubiertas con celulosa (Merck, U.K., 0.2 mm) se les aplicó el extracto de Jamaica (1.2 ml de extracto al 26% p/v) y posteriormente fueron secadas con aire frío.

Una vez logrado el equilibrio del disolvente (sistema BAW: n-butanol- ácido acético-agua (4:1:5) almacenado 3 días, fase superior) en la cámara de elusión, las placas fueron cuidadosamente inmersas en el tanque y eluidas en la oscuridad. Se detectaron dos bandas coloreadas: púrpura ( $R_f$  0.122) y rosa ( $R_f$  0.143). Éstas fueron raspadas y recuperadas para ser sumergidas en metanol acidificado y posteriormente filtradas. El disolvente fue evaporado con  $N_2$  y el residuo en polvo resultante de cada banda (antocianina), fue almacenado a  $-18^\circ C$  hasta su uso.

### 3.2.3 Caracterización

#### 3.2.3.1 Análisis de absorción UV/Visible ( $\lambda$ 200 a 700 nm)

Espectros en el UV y visible fueron obtenidos de cada glicósido. Los resultados mostraron obediencia a la Ley de Lambert-Beer para concentraciones entre 40 ppm y 240 ppm de pigmento. Estos resultados están de acuerdo con datos reportados en la literatura (Timberlake y Bridle, 1975).

#### 3.2.3.2 Hidrólisis

Para la determinación de azúcares y agliconas, se tomó una muestra de cada una de las antocianinas aisladas (1mg) y se hidrolizaron con HCl 2N (2 ml, 30 min a 100 °C). Una vez terminada la hidrólisis, se adicionó 1 ml de alcohol isoamílico para separar la aglicona y los azúcares.

Con el objetivo de conocer la posición de la glicosilación, se realizó una oxidación con peróxido de hidrógeno la cual es específica para azúcares unidos en posición 3 (Chandler y Harper, 1961; Harborne y Dey, 1989; Francis, 1982). A 1 mg del pigmento aislado disuelto en metanol se le agregaron gotas de peróxido de hidrógeno al 3% hasta la decoloración. Posteriormente se agregó 1ml de hidróxido de amonio concentrado, se concentró y se realizó una cromatografía en capa fina (Sección 3.2.2.1) de los pigmentos intactos y los sometidos al tratamiento con peróxido para comparar sus Rf's.

#### 3.2.3.3 Identificación de Agliconas

##### 3.2.3.3.1 Análisis por Cromatografía en Capa Fina

En una cromatoplaca de vidrio recubierta con celulosa, se aplicaron las agliconas junto con sus respectivos estándares comerciales: cloruro de cianidina y cloruro de delfinidina (Extrasynthese, Genay, France). Las placas fueron desarrolladas con el sistema de elusión FORMICO (ácido fórmico-HCl-agua, 5:2:3).

##### 3.2.3.3.2 Análisis por HPLC.

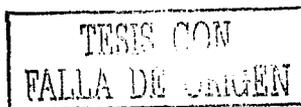
Se seleccionó la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia porque permite un rápido y no destructivo análisis de los pigmentos (Mazza, 1986; Hale et al., 1986; Pouget, 1990; Fernandez-Lopez et al., 1992).

El análisis se realizó de acuerdo al procedimiento reportado por Mazza (1986) con el siguiente perfil de elusión:

Solución A: ácido fórmico-agua (5:95) y disolvente B: metanol, grado HPLC filtrados a través de un filtro millipore de 0.45  $\mu$ m

0-10 min, 17-22% B en A (gradiente lineal);

10-12 min, 22-27% B en A (gradiente lineal);



12-33 min, 27-37% B en A (gradiente lineal);

33-40 min, 37-55% B en A (gradiente lineal).

Columna pre-empacada de Kromasil (250 x 4mm), 5 $\mu$ m (Hichrom, Reading, U.K.)

Velocidad de flujo: 1.0 ml/min, presión en la columna: 50-60 bar, simultánea detección multibanda a 260, 280, 330, 530 y 540 nm. La concentración de pigmento inyectado fue 1.0-3.0 mM (considerada como delphinidina). Se prepararon soluciones estándares (2mM) de cloruro de delphinidina y cianidina comerciales, utilizando metanol acidificado (1% HCl).

Se utilizó un sistema autoanalizador de HPLC, Hewlett Packard Series 1050 con detección UV-Visible de arreglo de diodos, válvula de inyección con un rizo de 20  $\mu$ L.

### 3.2.3.4 Identificación de azúcares

#### 3.2.3.4.1 Análisis por Cromatografía en Capa Fina

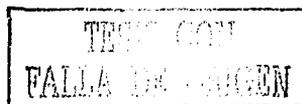
En una cromatoplaqueta de vidrio recubierta con celulosa, se aplicaron los azúcares junto con sus respectivos estándares comerciales: glucosa, galactosa, arabinosa, fructosa, xylosa (Sigma Aldrich, U.K.).

La placa fue desarrollada con el sistema FENOLICO: fenol-agua(4:1). Una vez terminado el tiempo de elusión, la placa fue sumergida en el reactivo revelador de azúcares (Sigma Aldrich, U.K.): ácido *o*-ftálico (16.6g) y anilina (91 ml) disueltos en 250 ml de 1-butanol:éter dietílico:agua (48:48:4 v/v), y posteriormente secada y calentada a 105 °C por 2-3 minutos para visualización.

#### 3.2.3.4.2 Análisis por Cromatografía de Gases

El análisis se realizó de acuerdo al método reportado por Gao y Mazza (1994), con una columna capilar empacada con sílica 1  $\mu$ m, 30 m X 0.25 mm d.i., 14% cianopropilfenil y 86% copolímero de dimetilsiloxano, J&W DB-1701 (J&W Scientific, Inglaterra) y con el siguiente programa de temperatura: temperatura inicial de la columna: 120 °C (sin mantener la temperatura); incremento a 180 °C con una velocidad lineal de 20 °C/min, seguido de un incremento de 5 °C/min hasta 200 °C. La temperatura del inyector y del detector fue de 250 °C. El gas acarreador que se utilizó fue helio a un flujo de 0.5 ml/min y con una inyección dividida en una proporción de 25.

La derivatización de los azúcares obtenidos de los hidrolizados de las antocianinas, se llevó a cabo por el procedimiento reportado por Sweeley y sus colaboradores (1963) con reducción en los volúmenes de los reactivos utilizados (Sigma Aldrich, U.K.); la piridina fue de 50  $\mu$ l y los volúmenes de trimetilclorosilano (TMS) y hexametildisilazano (HMDS) fueron de 25  $\mu$ l cada uno.



### **3.2.4 Estabilidad de Color**

#### **3.2.4.1 Preparación de Soluciones. Análisis UV-Visible**

##### **1) Solución Almacenada Diluida (DI)**

Una muestra de Flor de jamaica fue extraída con agua destilada en una proporción 1:10, a temperatura de ebullición durante 15 minutos. Una vez enfriada, se tomaron cuatro alícuotas y se diluyeron 1:5. Estas cuatro soluciones, se almacenaron a 4 °C, 20 °C, 30 °C y 37 °C por 72 horas. Se realizó un monitoreo colorimétrico y espectrofotométrico cada 12 horas. Se utilizó un colorímetro Hunter-lab ColorQuest Instrument.

##### **2) Solución Almacenada Concentrada (CI)**

De la misma infusión descrita anteriormente (1:10) se tomaron cuatro porciones y se almacenaron a 4 °C, 20 °C, 30 °C y 37 °C por 72 horas. Cada 12 horas, se tomó una alícuota de cada solución y se diluyó en una proporción 1:5. Se realizaron mediciones de color y de absorbancia para cada solución.

#### **3.2.4.2 Análisis Sensorial**

##### **3.2.4.2.1 Selección y Entrenamiento de los Panelistas**

Catorce voluntarios en buen estado de salud, miembros de la Escuela de Bio-ciencias de la Universidad de Reading, Inglaterra, de edades comprendidas entre 24 y 45 años, fueron entrenados para reconocimiento y diferenciación de los cuatro gustos básicos y sensación de astringencia. Entrenamientos posteriores consistieron en reconocimiento de aromas y colores.

Los panelistas seleccionados fueron capaces de percibir e identificar todos los gustos, sensación de astringencia, aromas y colores.

##### **3.2.4.2.2 Condiciones Generales para el Análisis**

Todos los experimentos se llevaron a cabo en paneles aislados, a temperatura ambiente (20-23 °C), bajo luz artificial D<sub>65</sub>, 800 LUX de intensidad.

Las sesiones se realizaron dos veces por semana de 11:00 a.m. a 2:00 p.m.

##### **3.2.4.2.3 Preparación de las Muestras**

###### **1) Solución Control (CS)**

Una muestra de Flor de jamaica (50g) fue extraída en caliente con 500 ml de agua para beber (EVIAN). Una vez enfriada, se tomó una alícuota de 100 ml y se diluyó a 500 ml. Antes de presentar esta solución a los panelistas, se midió la absorbancia.

###### **2) Solución Almacenada Diluida (DI)**

Una muestra de Flor de jamaica (50 g) fue extraída en caliente con 500ml de agua para beber (EVIAN). Una vez enfriada, se tomó una alícuota de 100 ml y se diluyó a 500 ml. Esta solución, se incubó a 20 °C, por 12 horas. Después del tiempo de

almacenamiento (equilibración) se midió la absorbancia y se diluyó para obtener un valor similar al control.

### **3) Solución Almacenada Concentrada (CI)**

De la misma infusión descrita anteriormente (50g/500ml) se tomaron otros 100 ml y se almacenaron a 20 °C por 12 horas. Una vez pasado el tiempo de almacenamiento, la alícuota de 100 ml se diluyó a 500 ml y se midió la absorbancia. Se realizó la dilución pertinente para alcanzar un valor similar al control.

Todas las muestras se presentaron al mismo tiempo al panelista

#### **3.2.4.2.4 Diseño Experimental**

Todas las soluciones preparadas se presentaron a los panelistas con el propósito de desarrollar un vocabulario común, es decir, una serie de descriptores para apariencia, aroma, sabor y resabio de cada bebida.

Una vez que los panelistas acordaron todos los atributos para cada solución, se les pidió que evaluarán la intensidad de cada atributo en todas las muestras (sección 3.2.4.2.5).

Dos series con diferentes niveles de azúcar (0 y 10%) fueron presentadas a los panelistas. Cada serie consistió de tres soluciones (recién preparada (control), almacenada concentrada, almacenada diluida), en las cuales se evaluó la intensidad de cada uno de los atributos desarrollados en una sesión previa.

#### **3.2.4.2.5 Presentación de las Muestras y Evaluación**

Se proporcionaron muestras de 20 mL contenidas en pequeñas copas de porcelana, a temperatura ambiente y codificadas azarosamente con tres dígitos.

Se les pidió que se enjuagaran la boca con agua antes de empezar el experimento y agitar la muestra dentro de la boca por cinco segundos y expectorarla en los vasos desechables provistos. Todas las soluciones se prepararon inmediatamente antes de su evaluación.

La intensidad de todos los atributos fue evaluada en una escala no estructurada de 100 mm de longitud y marcada en cada extremo con "nada" y "extremadamente"

Para extraer la información de las escalas, se utilizó el programa de computación FORMIC.

#### **3.2.4.2.6 Análisis de Datos**

El análisis de datos se llevó a cabo con la ayuda del paquete estadístico comercial MINITAB. Para cada atributo evaluado, se realizó un análisis univariado (ANOVA), mientras que para cada categoría (apariencia, aroma, sabor y resabio) se realizó un análisis multivariado (MANOVA). Los gráficos de interacciones entre factores, así como de efecto principal y de matriz, se llevaron a cabo para el análisis con un nivel de significancia de  $p < 0.005$  y fueron usados como criterios de significancia estadística.

### 3.2.5 Estabilización de Color

#### 3.2.5.1 Co-pigmentación

Cantidades conocidas de co-pigmento (CoP) [ácido clorogénico (CGA) o ácido málico (MA)] fueron adicionadas a volúmenes conocidos de extracto acuoso de flor de jamaica obtenido en caliente (RE), liofilizado y reconstituido con las soluciones amortiguadoras. El análisis se llevó a cabo variando la proporción de CoP:RE (1:1 y 5:1 para cada co-pigmento respectivamente) y el pH (1,2,3 y 4.2) se utilizó el extracto acuoso de jamaica como control, su concentración fue  $4.5 \times 10^{-3}$  M calculada como cloruro de delphinidina.

##### 3.2.5.1.1 Análisis UV-Visible

Se obtuvieron valores de absorbancia a las longitudes de onda de máxima absorción de todas las soluciones co-pigmentadas a diferentes pHs. Las soluciones amortiguadoras puras se utilizaron como blanco.

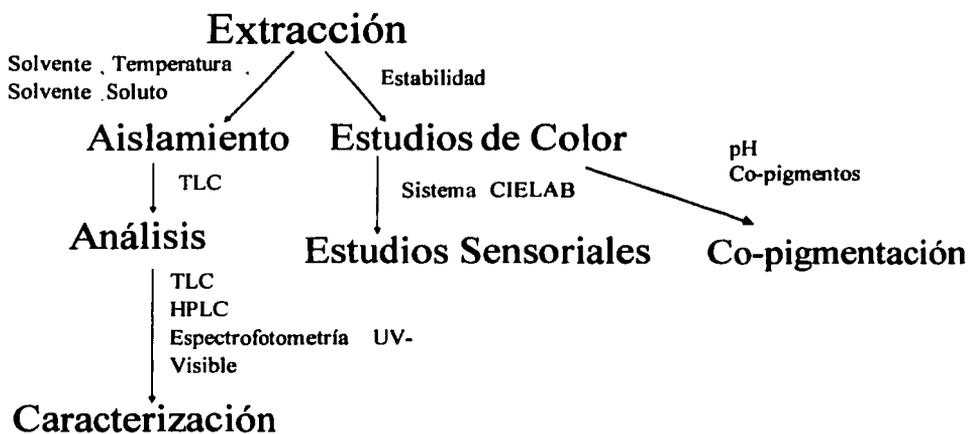
##### 3.2.5.1.2 Análisis Colorimétrico

Las coordenadas de color se obtuvieron con un iluminante estándar  $D_{65}$  (tipo luz de día) como referencia y un ángulo de observador de  $10^\circ$ .

El croma,  $C^*$ , y el ángulo de tono,  $h$ , se obtuvieron por la transformación de las coordenadas cartesianas ( $a^*$ ,  $b^*$ ) a coordenadas polares de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0.5} \quad \text{y} \quad h = \arctan(b^*/a^*)$$

La metodología del trabajo experimental se resume a grandes rasgos en el siguiente esquema



## 4.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Extracción. Análisis UV-Visible

Todos los extractos presentaron una  $\lambda_{\max}$  a 288 nm de acuerdo con la información publicada para flavonoides (Harborne, 1967, Markham, 1982). Las longitudes de onda de máxima absorción visible de los extractos fueron de 514 nm a 542 nm dependiendo de las condiciones de extracción (Tabla II). El rendimiento de sólidos y contenido de antocianinas que se obtuvo para cada condición de extracción se muestra en la Tabla II.

Tabla II. Rendimiento de Antocianinas<sup>(1)</sup> en Extractos de Flor de Jamaica<sup>(2)</sup> obtenidos en Diferentes Condiciones (Únicamente Primera Extracción).

| CONDICIONES DE EXTRACCIÓN                | $\lambda_{\max \text{ vis}}$ (nm) | RENDIMIENTO <sup>(1)</sup>              |  |
|--|-----------------------------------|---|--|
|  |                                   | g sólidos/ 100 g Flor (base húmeda) (3) | g pigmento/100 g Flor (base húmeda)(3) |
| MeOH (15 min, T ebullición)              | 536.1                             | 43.5                                    | 0.321                                  |
| MeOH (24 horas, 4 °C)                    | 534.6                             | 45.02                                   | 0.2689                                 |
| EtOH 50% ( 24 horas, 4 °C)               | 533.3                             | 46.93                                   | 0.2564                                 |
| EtOH 50% ( 15 min, T ebul.)              | 534.6                             | 43.66                                   | 0.2281                                 |
| H <sub>2</sub> O (15 min., T ebullición) | 514.0                             | 44.19                                   | 0.2247                                 |
| H <sub>2</sub> O (24 horas, 4 °C)        | 517.6                             | 47.83                                   | 0.2156                                 |

(1) Medido por Espectrofotometría Visible ( $\lambda_{\max}$ ) y calculado como delfinidina.

(2) Concentración de 10 a 60 mg/ml.

(3) Humedad 44 %

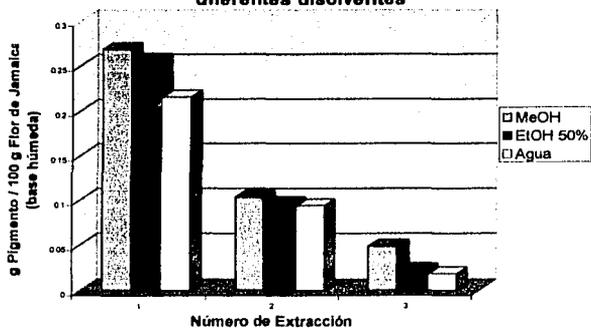
El mayor rendimiento de pigmento obtenido fue con la extracción en metanol, seguido de la mezcla etanol:agua al 50% y en tercer lugar con agua.

El rendimiento total obtenido de un mismo lote de flor de jamaica, después de dos extracciones sucesivas con metanol (15 min, 65 °C) y medido espectrofotométricamente (Tabla II) fue de 1% (masa/masa) expresado en base seca. Este resultado es preliminar, ya que fue determinado como si únicamente hubiera delfinidina en el extracto. El contenido real de cada glicósido fue determinado por HPLC y se discutirá más adelante.

Estudios posteriores serán dirigidos a obtener mayores rendimientos de pigmento para realizar estudios de estabilización de los pigmentos aislados.

Para obtener el contenido total de antocianinas fue necesario realizar más de una extracción (Figura 4).

a) Extracciones Consecutivas en frío utilizando diferentes disolventes



b) Extracciones Consecutivas en Caliente utilizando diferentes disolventes

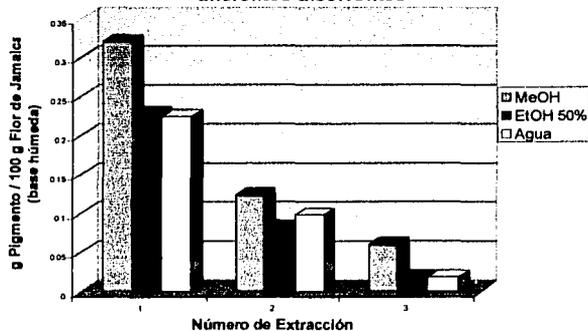


Figura 4 . Rendimiento de Pigmento obtenido en Tres Extracciones Consecutivas Bajo Diferentes Condiciones: a) 24 horas a 4 °C b) 15 minutos a T ebullición

Rendimiento de Pigmento en Función del Volumen de Disolvente. Extracciones en Caliente.

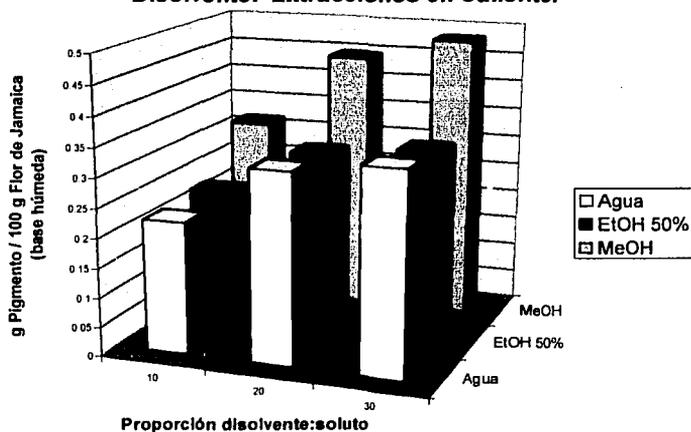


Figura 5. Rendimiento de Pigmento en Función del Volumen de Disolvente Condiciones de Extracción: 15, 30 y 45 minutos a T ebullición respectivamente.

La variación en la proporción de disolvente:soluto de 10, 20 y 30 (v/m) está representada en la Figura 5. Se puede apreciar que al utilizar la proporción 20:1 en una sola extracción (Fig.5), se logra el mismo rendimiento que al realizar dos extracciones consecutivas (Fig.4 b), lo cual se traduce en un ahorro de tiempo y esfuerzo, es decir en la optimización de la extracción.

Comparando el rendimiento de pigmento obtenido al utilizar las proporciones 20:1 y 30:1, se puede apreciar que el aumento es mínimo, por lo cual se utilizó la proporción disolvente:soluto de 20:1 para todas las extracciones realizadas.

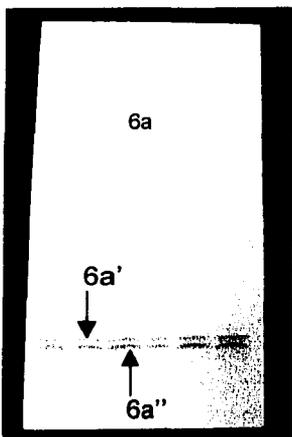
Los índices de degradación (Tabla III), indicaron que los extractos acuosos tienden a degradarse más fácilmente que los extractos metanólicos debido a la susceptibilidad del catión flavilo al ataque nucleofílico (Markakis et al., 1957). El agua tiene una fuerte actividad nucleofílica, la cual produce pseudobases carbinol (no coloridas) y formas chalconas. Es notable que el índice de degradación sea más alto a 4 °C. Este resultado es completamente inesperado debido a que normalmente la cinética de una reacción es menor a bajas temperaturas, sin embargo, la cinética de degradación de las antocianinas es todavía desconocida y el tiempo de extracción debe ser considerado como un factor importante para la degradación. El calentamiento también excluye aire disuelto, provocando un efecto en la disponibilidad del oxígeno lo cual reduciría las reacciones oxidativas.

**Tabla III. Índices de Degradación para Extractos Metanólicos y Acuosos obtenidos a Alta y Baja Temperatura**

| Condición Extractiva               | Índice de Degradación |
|------------------------------------|-----------------------|
| MeOH (15 min, 65 °C)               | 1.16                  |
| H <sub>2</sub> O (15 min., 100 °C) | 1.41                  |
| MeOH (24 horas, 4 °C)              | 2.21                  |
| H <sub>2</sub> O (24 horas, 4 °C)  | 2.30                  |

## 4.2 Aislamiento

Las dos antocianinas obtenidas por Cromatografía en capa fina (TLC), una púrpura ( $R_f = 0.122$ , Figura 6a') y otra rosa ( $R_f = 0.143$ , Figura 6a''), se analizaron por HPLC. La respuesta cromatográfica fue monitoreada simultáneamente a 260, 280, 330, 535 y 540 nm.



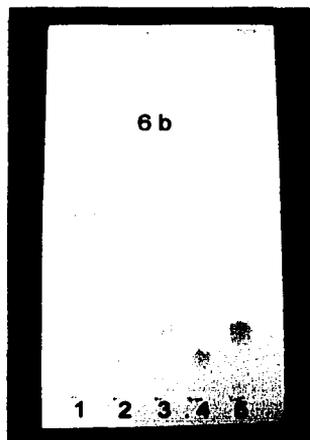
6a. Cromatografía en Capa Fina del Extracto de Flor de Jamaica

La señal obtenida de 6a'' (antocianina púrpura) presentó una  $\lambda_{max}$  a 535 nm, eluyendo a un tiempo de retención ( $R_t$ ) de 15.3 min, mientras que 6a' (antocianina rosa), presentó una  $\lambda_{max}$  a 530 nm y eluyó a un  $R_t = 19.1$  min (Figura 7). Estudios similares reportados en la literatura sugieren que las estructuras bajo estudio son glicósidos de delphinidina y cianidina respectivamente (Mazza, 1986; Harborne, 1967; Hale et al., 1986).

## 4.3 Caracterización

### 4.3.1 Identificación de Agliconas

Con la hidrólisis ácida total de los glicósidos aislados, seguido de una cromatografía en capa fina de las agliconas, fue posible confirmar la identidad de las estructuras usando estándares comerciales de cianidina y delphinidina puras (Figura 6b). Posteriormente, estas agliconas se analizaron por HPLC comparándolas con las agliconas comerciales (Figura 7). Los tiempos de elusión obtenidos para los hidrolizados coinciden con aquellos obtenidos para los estándares comerciales (30.5 min a 535 nm y 38.4 min a 530 nm para delphinidina y cianidina respectivamente).



6b. Identificación de las agliconas: 1) Extracto de Jamaica, 2) Aglicona de 6a'' 3) Aglicona de 6a' 4) Delphinidina estándar, 5) Cianidina estándar



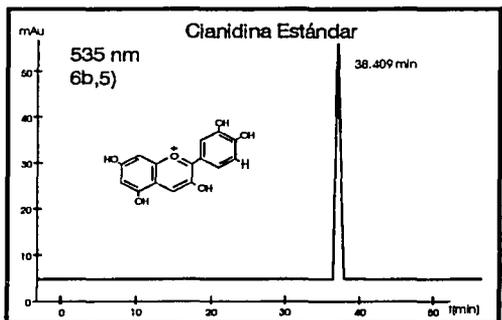
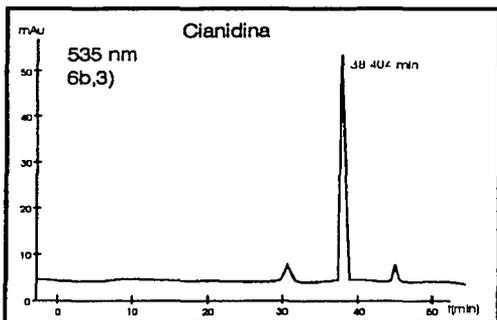
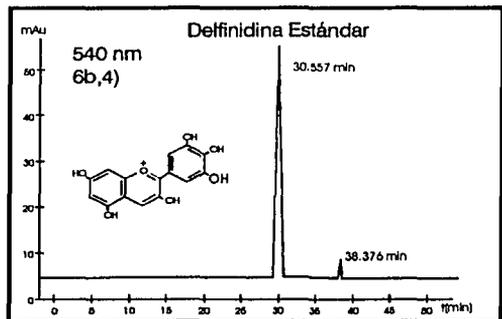
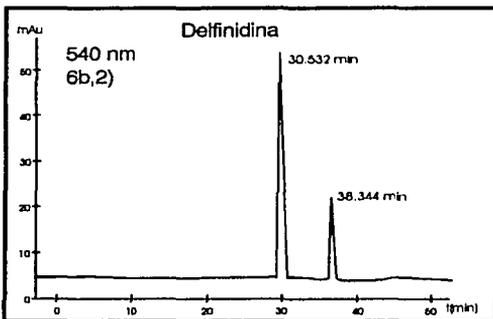
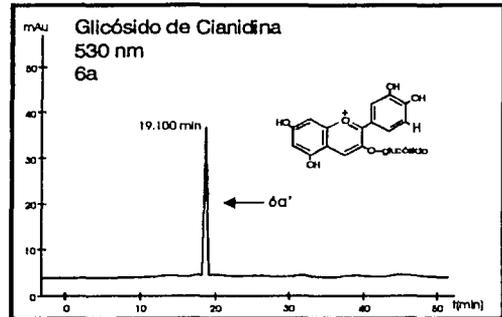
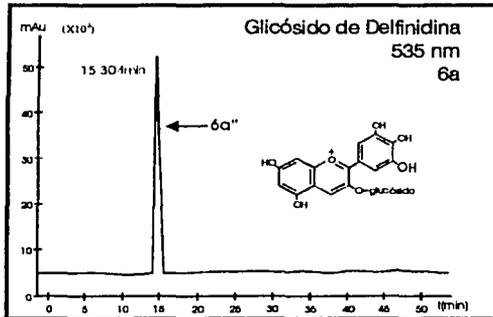
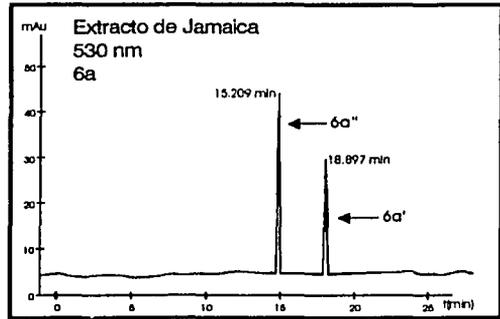
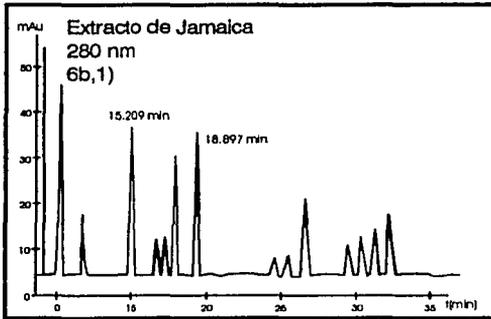
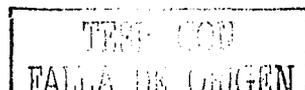
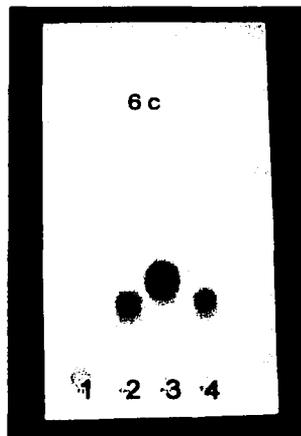


Figura 7. Identificación de las Agliconas de los Pigmentos de la Flor de Jamaica por RP-HPLC



### 4.3.2 Identificación de Azúcares

Las fracciones de azúcares obtenidas de la hidrólisis de los glicósidos, fueron preliminarmente analizadas junto con estándares comerciales por cromatografía en capa fina, sugiriendo una mezcla de glucosa y xilosa (Figura 6c). Posteriormente, las fracciones de azúcares fueron sililadas y analizadas por cromatografía de gases (GC), se compararon con una solución estándar de glucosa y xilosa sililada (Figura 8). Los tiempos de retención obtenidos para los hidrolizados, coinciden con aquellos obtenidos para los estándares a 7.3 min para la glucosa en su forma  $\beta$  y 4.8 min, 5.1 min y 5.4 min para las formas anoméricas de la xilosa.



6c. Identificación de Azúcares: 1) Azúcares de 6a', 2) y 4) Glucosa std., 3) Xilosa std.

Con respecto a la posición de la glicosilación, se encontró que los  $R_f$ 's obtenidos de los glicósidos tratados con peróxido de hidrógeno, eran diferentes a los  $R_f$ 's de los glicósidos que no fueron sometidos al tratamiento, lo cual significa que dichos glicósidos fueron oxidados y por lo tanto presentan glicosilación en el C 3, ya que el peróxido de hidrógeno oxida específicamente glicósidos en posición 3 (Chandler y Harper, 1961; Harborne y Dey, 1989; Francis, 1982).

Los azúcares que se obtuvieron del tratamiento con peróxido de hidrógeno, se sometieron a un análisis de cromatografía en capa fina con el objeto de conocer su identidad, encontrándose nuevamente la presencia de xilosa y glucosa. Así, se sabe que la posición 3 del esqueleto flavonoide está glicosilado por xilosa y glucosa.

Mediante cromatografía de gases se cuantificaron los azúcares obtenidos de la oxidación con peróxido y la fracción obtenida de la hidrólisis con HCl, encontrándose el mismo contenido de azúcares para ambas fracciones. Esto descarta la posibilidad de tener glicosilaciones en el carbono 5.

De esta forma, es posible concluir que las antocianinas presentes en la flor de jamaica son 3-glicósidos de cianidina y delphinidina

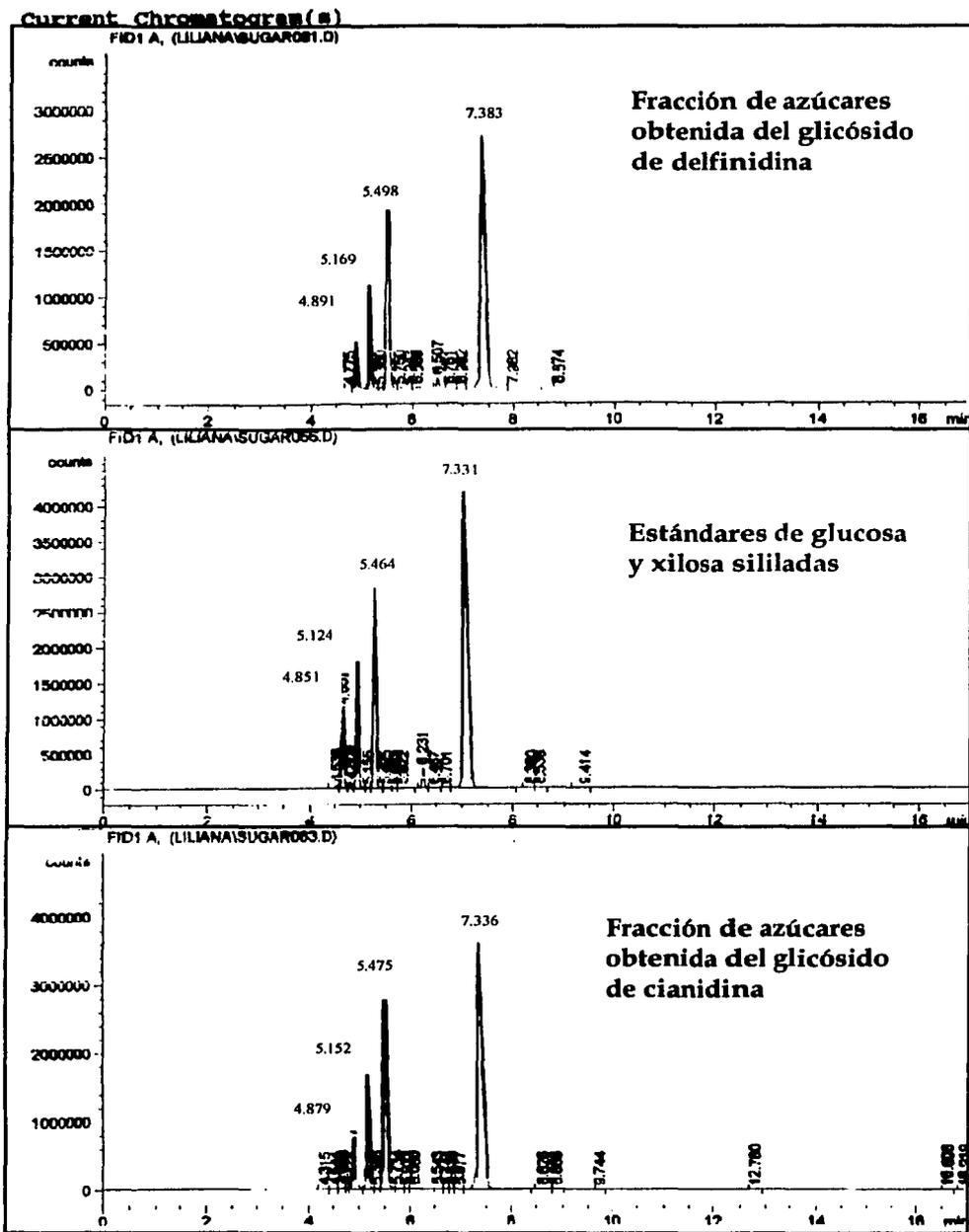


Figura 8. Identificación de los Azúcares de los Pigmentos de la Flor de jamaica por Cromatografía de Gases (GC)

## **4.4 Cuantificación**

### **4.4.1 Agliconas**

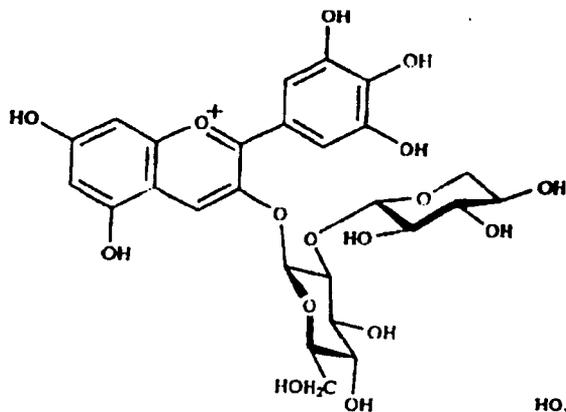
El contenido total de pigmento cuantificado mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia es de 1.2g/100g de flor (base seca) del cual el 41% del pigmento está dado por cianidina y el 59% por delfinidina (Anexo II). Este resultado es parecido al obtenido por espectrofotometría. La diferencia en ambas determinaciones es debida a que en el análisis espectrofotométrico se consideró al pigmento de la flor como delfinidina pura, esto se traduce en una subestimación del contenido real, ya que la delfinidina tiene un coeficiente de absortividad molecular mayor al de los glicósidos.

### **4.4.2 Azúcares**

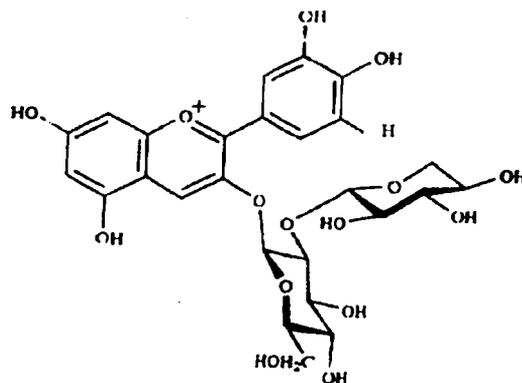
El contenido de glucosa obtenido de la hidrólisis de la fracción de delfinidina resultó ser de 0.37g/100g de flor (base seca) y el de xilosa de 0.31g/100g de flor (base seca). La cantidad de glucosa determinada para la fracción hidrolizada de cianidina fue de 0.28g/100g de flor (base seca) y de xilosa de 0.23g/100g de flor (base seca) (Anexo III).

Estos resultados junto con la cuantificación de agliconas, sugieren que los pigmentos en la flor de jamaica son diglicósidos (conformados por una molécula de xilosa y otra de glucosa) de cianidina y delfinidina (Anexo III).

La información anterior coincide con las estructuras reportadas por Harborne en 1991 y Francis en 1975, para las antocianinas presentes en flor de jamaica:



**diglicósido de delphinidina**



**diglicósido de cianidina**

## 4.5 Estabilidad de Color

### 4.5.1 Análisis Colorimétrico

Una descripción básica de color requiere el uso de tres atributos: tono (o tonalidad cromática), saturación o croma (pureza) y luminosidad (una medida de efectividad de la fuente de luz para producir la sensación de luminosidad). Esto es porque aunque el color es originado por una selectiva absorción de radiación visible por el objeto (en este caso pigmentos), no es un fenómeno físico, sino psicosensorial, precisamente situado en la interfase de tres elementos: una fuente de luz, un objeto (una solución de pigmento en el presente contexto) y un observador ( el ojo y la corteza visual en el cerebro). De tal manera que cualquier cambio que afecte la definición espectral en cualquiera de los atributos anteriormente citados, causará

variaciones en la percepción del color (Gonnet, 1998). Por tanto, no existe el color en términos absolutos, consecuentemente, el análisis de color requiere que la luz de referencia y las condiciones del observador sean primeramente establecidas (McDougall, 1988).

Las coordenadas colorimétricas: Luminosidad ( $L^*$ ), Croma o saturación de color ( $C^*$ ), ángulo del tono ( $h$ ) incluyendo  $a^*$  (rojo a azul) y  $b^*$  (amarillo a azul) representan la correlación psicométrica de los atributos naturales de la percepción humana del color.

En el círculo cromático mostrado en la Figura 9, los valores del ángulo del tono ( $h$ ) están escalonados en dirección contraria a las manecillas del reloj desde  $0^\circ$  -  $360^\circ$  (magenta-rojo) pasando a través de una gama de colores de entre los cuales  $90^\circ$  corresponde al amarillo,  $180^\circ$  al verde azulado y  $270^\circ$  al azul.

El Croma ( $C^*$ ) se refiere a la pureza o intensidad del color. Valores decrecientes en cromaticidad indican pérdida de color y valores crecientes indican aumento en la intensidad de la coloración. Este parámetro junto con el tono es un indicativo de la pureza o de posibles interacciones de compuestos que incrementen o disminuyan el color.

La luminosidad se refiere a la cantidad de luz que puede pasar a través de la solución en estudio. Sus valores van arbitrariamente de 0 a 100 y representan al negro y blanco respectivamente. Un valor de 100 en luminosidad se refiere a una solución cristalina como el agua que deja pasar el 100% de luz, por el contrario un valor de 0 en luminosidad se refiere a una solución tan oscura que no deja pasar luz a través de ella.

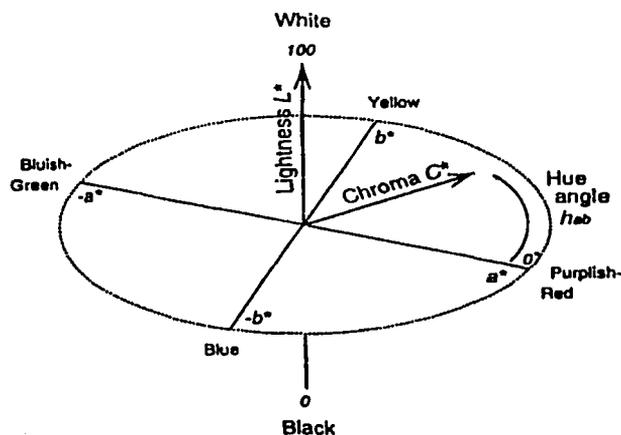
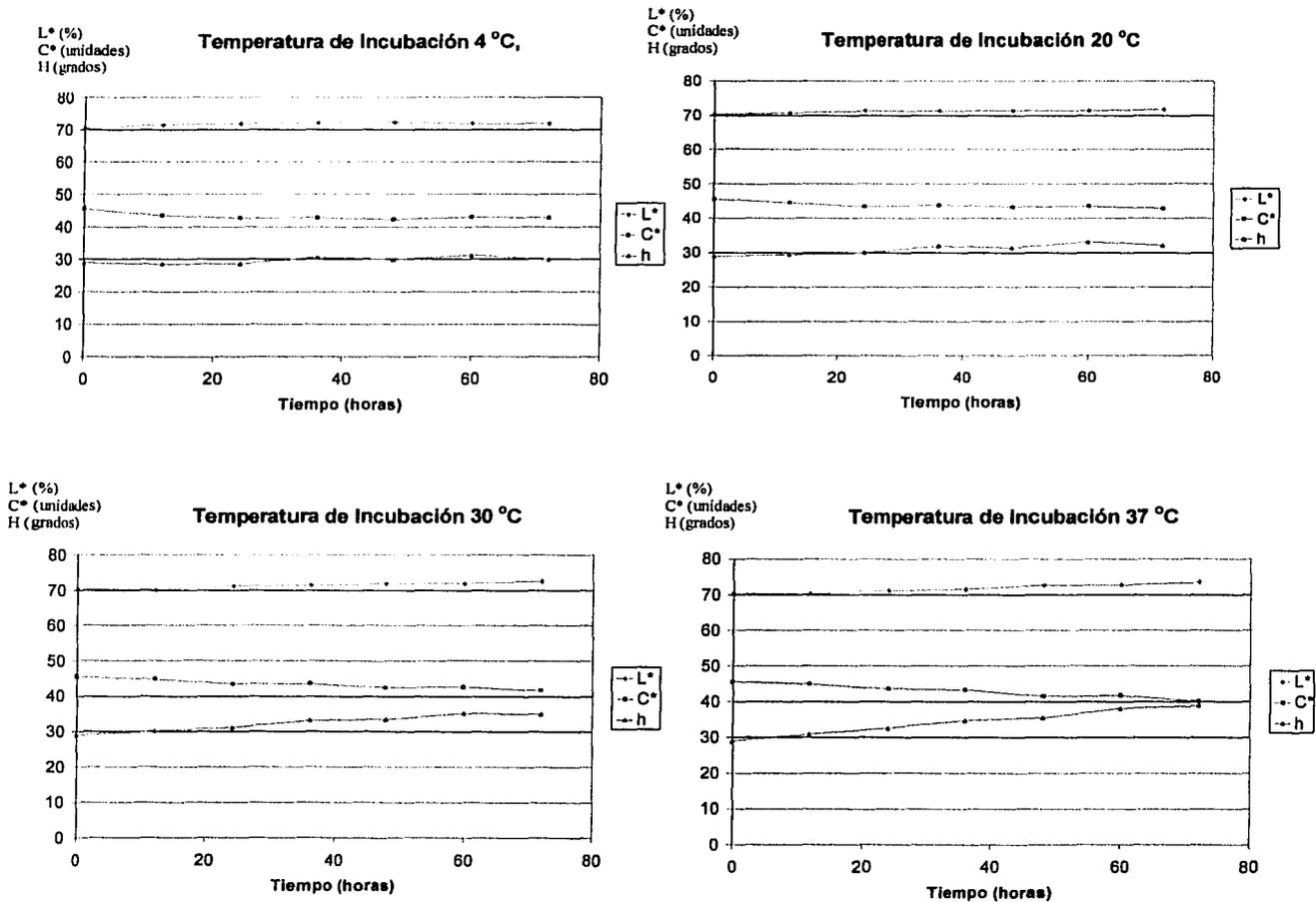
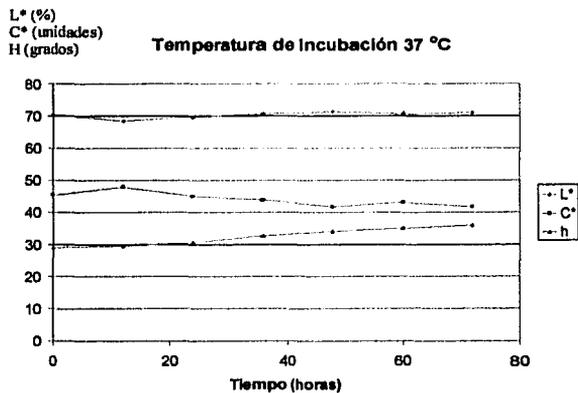
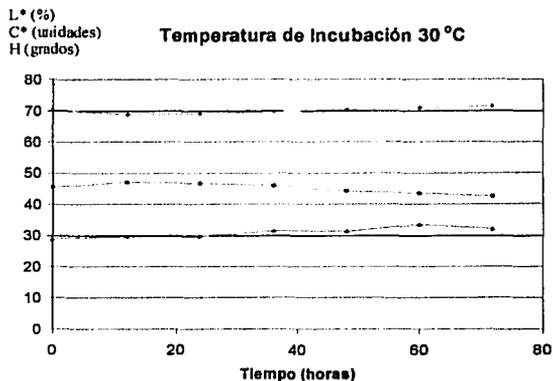
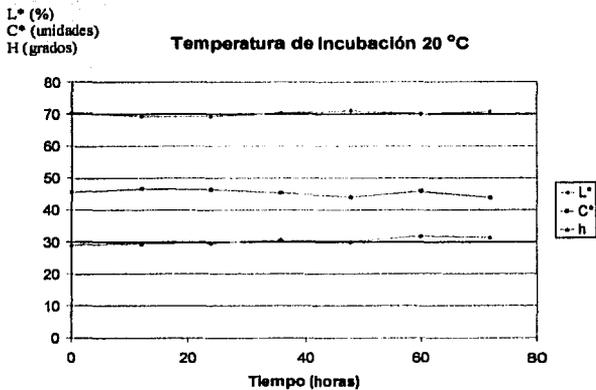
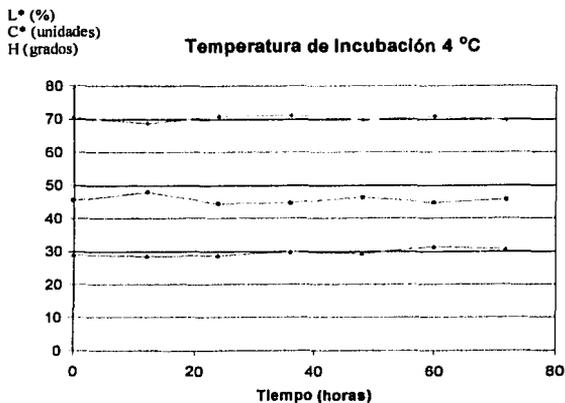


Figura 9. Espacio CIELAB

En las Figuras 10 y 11, se resumen los resultados de estabilidad de color en términos colorimétricos (luminosidad L\*, Cromo C\* y tono h) y en la Figura 12 en términos de absorbancia para las soluciones diluidas y concentradas respectivamente.



**Figura 10. Variación de los Parámetros Colorimétricos de Extractos Acuoso Diluidos de Flor de jamaica a 4 °C, 20 °C, 30 °C y 37 °C con respecto al tiempo. pH 2.5; Solutos:disolvente 1:50**



**Figura 11. Variación de los Parámetros Colorimétricos de Extractos Acuoso Concentrados de Flor de jamaica a 4 °C, 20 °C, 30 °C y 37 °C con respecto al tiempo. pH 2.5; soluto:disolvente 1:5**

En términos colorimétricos, los resultados revelan que al paso del tiempo, el tono del color cambia para las soluciones diluidas (Figura 10). Esto es que el ángulo de tono aumenta con el incremento del tiempo (29-38, para la mayor temperatura de almacenamiento), lo que en el espacio CIELAB significa pérdida de color rojo (Figura 9). A su vez, el croma disminuye (45-40, para el mismo caso), lo cual se traduce en una pérdida de intensidad del color. Esto trae como consecuencia un aumento en la luminosidad (70-73, para el mismo caso) de las soluciones.

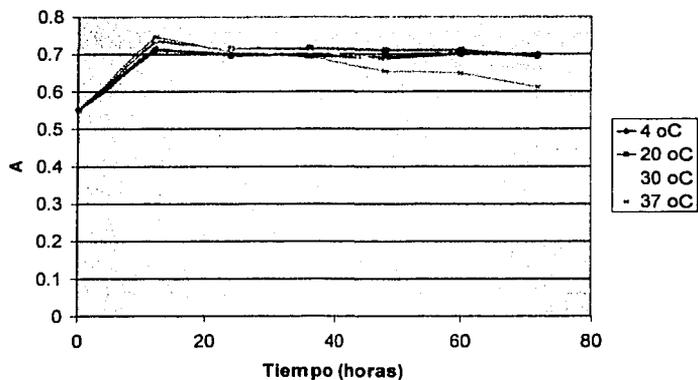
También es notable (Figura 10) que el efecto es más marcado con el aumento de la temperatura; la temperatura normalmente acelera la cinética de las reacciones, por lo que un aumento en ésta, provoca un aumento en la rapidez de las reacciones de degradación de los pigmentos.

De esta forma, estos no son resultados sorprendentes teniendo en cuenta la estabilidad química de las antocianinas. Sin embargo, al observar los resultados obtenidos con las soluciones concentradas (Figura 11), se ve claramente un incremento en el croma o intensidad de color, hasta llegar a un máximo y entonces inicia el descenso. El incremento máximo es a las doce horas de almacenamiento en todas las temperaturas, pero el descenso del máximo es mayor mientras mayor sea la temperatura de almacenamiento. Al observar los valores del ángulo del tono, vemos que a las doce horas se mantiene y conforme pasa el tiempo y el croma comienza a descender, el tono también empieza a perder coloración roja. Estos resultados de aumento de intensidad de color, se confirman con los resultados espectrofotométricos (Figura 12) en donde no sólo se ve el aumento de absorbancia para las soluciones concentradas, sino también para las diluidas, con un máximo de absorción a las 12 horas semejantes al observado en las soluciones concentradas. Sin embargo, el incremento de absorción con respecto a la solución control ( $t=0$ ) es menor en las soluciones diluidas que en las concentradas:

| Talmacenamiento | Incremento |             |
|-----------------|------------|-------------|
|                 | Diluida    | Concentrada |
| 4 °C            | 29%        | 65%         |
| 20 °C           | 33%        | 58%         |
| 30 °C           | 34%        | 60%         |
| 37 °C           | 35%        | 65%         |

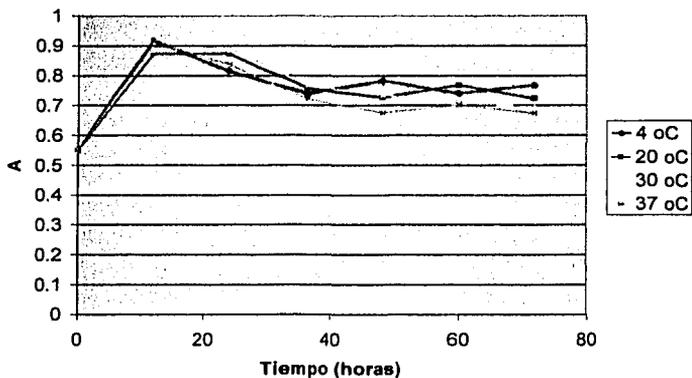
a)

**Absorbancia del Extracto Acuoso de Jamaica en  
Función del Tiempo y la Temperatura**



b)

**Absorbancia del Extracto de Jamaica en Función  
del Tiempo y la Temperatura**



**Figura 12. Variación de la Absorbancia de Extractos Acuosos de Flor de Jamaica a 4, 20, 30 y 37 °C con respecto al tiempo, pH 2.5**  
a) Soluto:disolvente 1:50    b) Soluto:disolvente 1:5

Tomando en cuenta los resultados colorimétricos, en las soluciones diluidas hay un mayor cambio en la tonalidad de los pigmentos, lo que se traduce en menor integridad de color.

De alguna manera, el aumento en la concentración de los extractos, está estabilizando el color en un período de tiempo determinado y está ofreciendo protección a la degradación provocada por la temperatura de almacenamiento.

Por otro lado, es perfectamente conocido que el color del vino tinto se debe principalmente a las antocianinas extraídas de las uvas, sin embargo, durante el añejamiento, hay un progresivo incremento de color rojo (Fernández-López et al, 1992). Esto significa que no siempre el almacenamiento produce un decremento en absorción, sino que puede incrementarlo, como lo vimos en los resultados obtenidos en este estudio. Este efecto ha sido reportado como un mecanismo de auto-asociación de antocianinas, en el cual se forman pigmentos poliméricos los cuales han mostrado ser mucho menos sensibles a factores oxidativos que los monómeros que los conforman (Somers, 1971; Ribereau-Gayon et al., 1983). Así, los resultados nos muestran que variando la concentración del extracto, tiempo y temperatura de almacenamiento, podríamos optimizar y maximizar el incremento de color en los extractos.

Esto no sólo representa posible auto-estabilización de las antocianinas mismas durante su almacenamiento, sino que tiene una gran importancia comercial al incrementar el color hasta un 65% en las condiciones estudiadas.

Ante esta perspectiva, surge la pregunta de que si diluyéramos una solución auto-asociada hasta alcanzar la apariencia original (en este caso, 58% para temperatura ambiente, 20 °C), ¿se mantendrían las características sensoriales originales? es decir, ¿sería perceptible la dilución?

Para resolver esta pregunta se realizó una evaluación sensorial.

#### **4.5.2 Análisis Sensorial**

Los descriptores desarrollados por el panel para las bebidas de Jamaica, se presentan en la Tabla IV.

Cabe aclarar que los descriptores fueron generados y acordados (sección 3.2.4.2.4) por el panel en el idioma inglés, por lo cual se respetó el origen de éstos para evitar confusiones en la traducción.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla IV. Descriptores Desarrollados para una Bebida de Flor de jamaica.**

| <b>ATRIBUTOS DESARROLLADOS POR EL PANEL</b> |              |                |                |
|---|--------------|----------------|----------------|
| <b>APARIENCIA</b>                           | <b>AROMA</b> | <b>SABOR</b>   | <b>RESABIO</b> |
| Sedimentation                               | Fruitiness   | Sweet flavour  | Sweetness      |
| Thickness                                   | Flower like  | Sour flavour   | Sourness       |
| Opacity                                     | Tea like     | Flower flavour | Bitterness     |
| Lightness                                   | Sourness     | Astringency    | Astringency    |
| Orange-red                                  | Sweetness    | Fruit flavour  | Fruitiness     |
| Red-pink                                    |              | Tea flavour    | Refreshing     |
| Pink-purple                                 |              | Refreshing     | Mouthwatering  |
| Brown tints                                 |              | Mouthwatering  |                |
|   |              | Metallic       |                |

Se evaluó la intensidad de cada atributo para cada una de las soluciones almacenadas a 20 °C y se procedió a realizar el análisis estadístico.

Se seleccionó la temperatura de almacenamiento de 20 °C, por ser la temperatura ambiente y no ocasionar ningún gasto extra de almacenamiento.

Primeramente, se realizó un análisis de varianza univariado (ANOVA) para todos los atributos pertenecientes a cada una de las 4 categorías: apariencia, aroma, sabor y resabio (Anexo I).

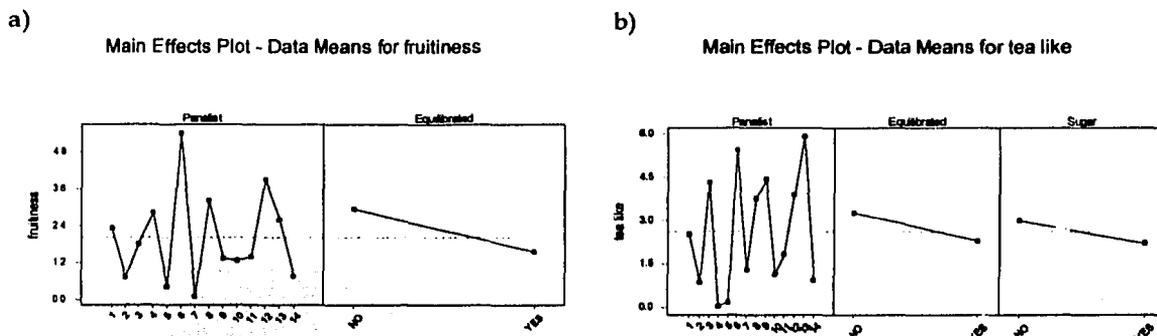
No se encontraron diferencias significativas para ninguno de los atributos pertenecientes a la categoría de apariencia, esto significa que la apariencia de una solución concentrada que fue almacenada y luego diluida a la misma concentración de la solución control y nuevamente diluida hasta igualar el valor de absorbancia de la solución control (58% de dilución fue necesario), es la misma apariencia que la de la solución control sin diluir, recién preparada. Lo mismo sucedió con la solución diluida almacenada y que posteriormente fue diluida un 33% para lograr la absorbancia inicial de la solución control. En otras palabras, el panel fue incapaz de diferenciar la apariencia de una solución diluida un 58% con respecto a la original.

Es posible que aunque no se detecten diferencias significativas para cada uno de los atributos entre las soluciones, existan interacciones entre atributos que den como resultado global un cambio significativo en la categoría, en este caso, apariencia. Con el propósito de analizar dichas interacciones, se realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA), el cual toma en cuenta al mismo tiempo todos los atributos que conforman la categoría a la vez. El resultado fue confirmatorio, no hubo diferencia significativa entre las apariencias de las soluciones.

Los resultados de los análisis estadísticos (ANOVA y MANOVA) para las categorías de sabor y resabio tampoco revelaron ninguna diferencia significativa

entre las soluciones para ninguno de los atributos. Únicamente se encontró diferencia significativa entre las soluciones con distinto nivel de azúcar, como era de esperarse (Anexo I).

Los resultados para la categoría de aroma difieren un poco de los anteriores. De acuerdo al análisis multivariado (MANOVA) existe diferencia significativa entre el aroma de las soluciones almacenadas (concentrada y diluida) y el aroma de la solución control original. Al consultar los resultados del análisis univariado (ANOVA), se observa que esta diferencia radica específicamente en la frutalidad y la nota a té de los extractos. Para conocer el sentido de la diferencia en estos atributos con respecto al almacenamiento de las soluciones, se trazaron las gráficas de efecto principal (Figura 13 a y b), en donde se observa que el almacenamiento (equilibración) disminuye la intensidad del aroma frutal y de la nota a té. Esto es debido a que el aroma está dado por compuestos volátiles, los cuales se pierden durante el proceso de almacenamiento provocando la pérdida de aroma.

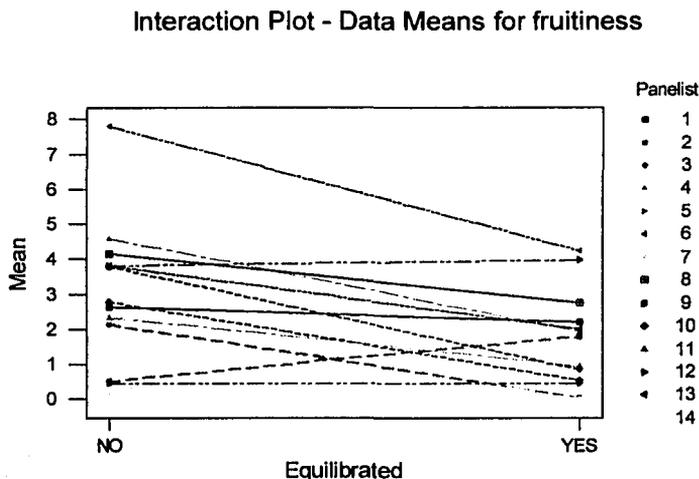


**Figura 13. Gráficas de Efecto Principal**

Otro factor que tiene efecto significativo sobre la percepción de la nota a té, es la presencia de azúcar en el extracto (Figura 13 b). Cuando el extracto no tiene azúcar, la intensidad de la nota a té es mayor. El azúcar puede actuar como enmascarante de esta nota.

En estas gráficas también fue incluido el efecto del panelista sobre el aroma frutal y la nota a té, ya que también se observó una diferencia significativa entre los juicios de los panelistas. De hecho, esta diferencia significativa entre los juicios de los panelistas está siempre presente en todos los análisis para todos los atributos. Es por esta razón que los panelistas forman un bloque dentro del análisis de

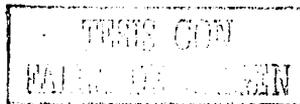
varianza. Esta variabilidad dada por los panelistas no es sorprendente ya que cada individuo tiene diferentes umbrales. Lo importante es que todos sigan la misma tendencia; para verificar que la variabilidad de los panelistas no afecta el análisis, se trazaron las gráficas de interacción entre factores (Figura 14), en donde se puede ver la interacción entre los juicios de los panelistas para el aroma frutal percibido de una solución almacenada y otra que no lo está. Es notorio que la mayoría de los panelistas siguen la misma tendencia: la solución almacenada tiene un aroma menos intenso que la solución control.



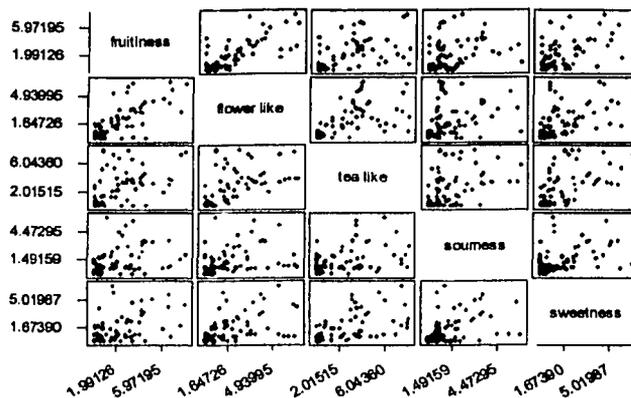
**Figura 14. Gráfica de Interacción entre Factores**

Con el objetivo de analizar las posibles interacciones entre respuestas, se trazó una gráfica de matriz que muestra las correlaciones entre atributos (Figura 15). Podemos ver que los puntos forman una línea recta con pendiente positiva entre el aroma frutal y el floral, esto quiere decir que cuando la intensidad de uno aumenta, el otro se ve afectado de la misma manera. Lo mismo sucede con el aroma floral y la nota a té, se observa una línea recta con pendiente positiva entre los dos atributos.

En resumen, los análisis estadísticos no revelaron diferencia significativa con respecto a apariencia, sabor y resabio entre la solución control y las soluciones diluidas en un 33% y 58%, sin embargo, revelaron diferencia significativa en el aroma frutal y el aroma a té. En otras palabras, los panelistas no fueron capaces de



detectar una dilución del 58% en las soluciones almacenadas. Este resultado abre una interesante propuesta para estudiar el mecanismo de auto-asociación de antocianinas no sólo como método de estabilización, sino como una importante contribución económica aún no explorada.



**Figura 15. Gráfica de Matriz para los Atributos de Aroma.**

#### 4.6 Estabilización de Color.

Los resultados de la co-pigmentación del extracto acuoso de jamaica (RE) con ácido clorogénico (CGA) y ácido málico (MA) como co-pigmentos (Figura 16), están sumariados en la Tabla V. Todos los sistemas presentaron efectos batocrómicos cuando se incrementa el pH, comparándolos con la solución RE. Esto podría sugerir un resultado positivo de co-pigmentación (Mazza y Brouillard, 1990), sin embargo, también se observó un decremento substancial en la cromaticidad (aproximadamente un 42% vs. el control), excepto a pH 4.2. En este caso, la solución de CGA:RE mostró un notable incremento en la absorbancia (37.5% y 87% sobre el control para proporciones de 1:1 y 5:1 de CGA:RE respectivamente).

Tabla V. Datos Espectrofotométricos de los Estudios de Co-pigmentación <sup>(1)</sup> del Extracto de Flor de jamaica.

| CONTROL                  |      |               | ÁCIDO CLOROGÉNICO   |               |                     |               | ÁCIDO MÁLICO       |               |                    |               |
|--------------------------|------|---------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|---------------|
| Extracto de Jamaica (RE) |      |               | 1:1CGA:RE (mol/mol) |               | 5:1CGA:RE (mol/mol) |               | 1:1MA:RE (mol/mol) |               | 5:1MA:RE (mol/mol) |               |
| PH                       | A    | $\lambda$ max | A                   | $\lambda$ max | A                   | $\lambda$ max | A                  | $\lambda$ max | A                  | $\lambda$ max |
| 1                        | 0.45 | 520           | 0.26                | 544           | 0.26                | 548           | 0.19               | 524           | 0.165              | 524           |
| 1.6                      | 0.38 | 519           | 0.28                | 548           | 0.27                | 548           | 0.19               | 532           | 0.16               | 528           |
| 2.2                      | 0.30 | 520           | 0.29                | 550           | 0.27                | 548           | 0.18               | 540           | 0.14               | 540           |
| 3                        | 0.27 | 520           | 0.26                | 560           | 0.27                | 552           | 0.175              | 544           | 0.145              | 548           |
| 4.2                      | 0.16 | 540           | 0.22                | 580           | 0.3                 | 562           | 0.175              | 536           | 0.16               | 560           |

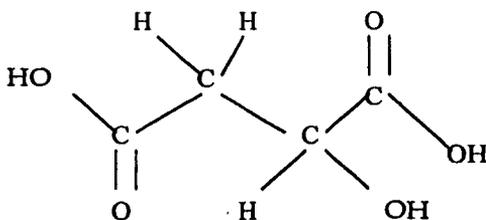
<sup>(1)</sup> Co-pigmentos: ácido clorogénico (CGA) y ácido málico (MA). La masa de los extractos liofilizados fue calculada como Delfinidina ( $\log \epsilon=4.4$ ).

Mazza y Brouillard (1990) reportaron resultados similares para cianidina co-pigmentada con ácido clorogénico. Sin embargo, en este experimento el color de la solución co-pigmentada se hizo substancialmente diferente al del extracto original (Tabla VI, Figura 17).

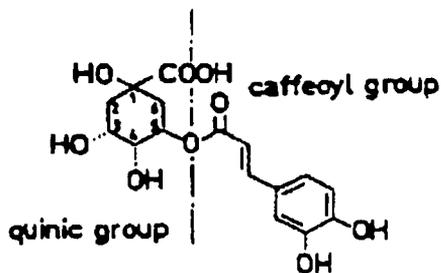
El espacio CIELAB está representado en la Figura 9, en donde es posible observar más claramente la contribución de cada uno de los parámetros para el color. Para una co-pigmentación exitosa se esperaría un decremento en los valores de  $b^*$  (amarillo a azul),  $L^*$  (luminosidad) y  $h$  (tono) y un incremento en los valores de  $a^*$  (rojo a verde) y  $C^*$  (croma). Esta hipótesis está basada en los principios de la co-pigmentación: el color de una solución co-pigmentada (en este caso jamaica) debe presentar un efecto hipercrómico (incremento en los valores de croma y  $a^*$ ) y un efecto batocrómico (decremento en los valores de  $b^*$  y por lo tanto en el tono).

De la Tabla VI y Figura 17, es evidente que la co-pigmentación no ocurrió en este experimento. A los valores de pH extremos para todos los sistemas (1 y 4.2), el ángulo de tono aumentó: para CGA-RE (1:1) de  $64.7^\circ$  a  $85^\circ$  y para CGA-RE (5:1) de  $64.7^\circ$  a  $80.5^\circ$ ; para MA-RE (1:1) de  $39^\circ$  a  $74.3^\circ$  y para MA-RE (5:1) de  $40.5^\circ$  a  $67.8^\circ$ , lo que se traduce en un decremento del color rojo.

a)



b)



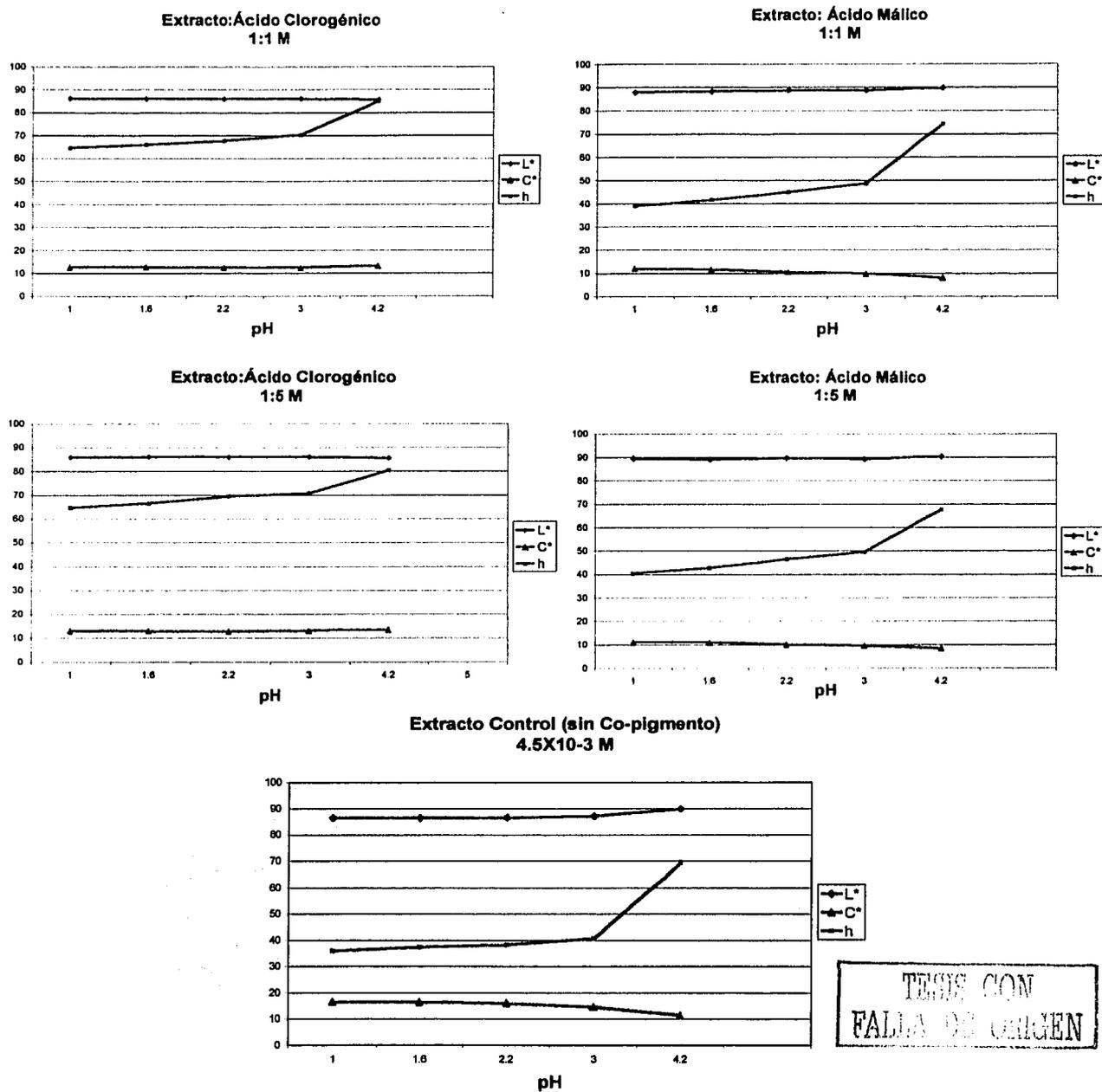
**Figura 16. Estructuras Químicas de los Co-pigmentos: a) Ácido Málico y b) Ácido Clorogénico.**

Tabla VI. Parámetros Colorimétricos de Sistemas Co-pigmentados de Flor de jamaica. Co-pigmentos: Ácido Clorogénico (CGA) y Ácido Málico (MA). Proporción de Co-pigmento / Pigmento <sup>(1)</sup> 1 y 5.

| CONTROL              |       |       |       |          |          |
|----------------------|-------|-------|-------|----------|----------|
| pH                   | L*    | a*    | b*    | C*       | h        |
| 1                    | 86.46 | 13.36 | 9.68  | 16.49824 | 35.92524 |
| 1.6                  | 86.39 | 13.01 | 9.95  | 16.37872 | 37.40863 |
| 2.2                  | 86.55 | 12.55 | 9.92  | 15.99715 | 38.32419 |
| 3                    | 87.09 | 11.03 | 9.46  | 14.53109 | 40.6184  |
| 4.2                  | 89.85 | 4     | 10.63 | 11.35768 | 69.37901 |
| CHLOROGENIC ACID     |       |       |       |          |          |
| 1:1 CGA:RE (mol/mol) |       |       |       |          |          |
| pH                   | L*    | a*    | b*    | C*       | h        |
| 1                    | 86.25 | 5.45  | 11.53 | 12.75317 | 64.70084 |
| 1.6                  | 86.02 | 5.19  | 11.68 | 12.78118 | 66.04206 |
| 2.2                  | 86.02 | 4.76  | 11.66 | 12.59417 | 67.79308 |
| 3                    | 86.18 | 4.21  | 11.81 | 12.53795 | 70.37999 |
| 4.2                  | 85.74 | 1.15  | 13.25 | 13.29981 | 85.03959 |
| 5:1 CGA:RE (mol/mol) |       |       |       |          |          |
| pH                   | L*    | a*    | b*    | C*       | h        |
| 1                    | 86.04 | 5.57  | 11.8  | 13.04856 | 64.7311  |
| 1.6                  | 86.22 | 5.2   | 11.98 | 13.05988 | 66.53642 |
| 2.2                  | 86.11 | 4.48  | 12.1  | 12.90273 | 69.68303 |
| 3                    | 86.22 | 4.31  | 12.43 | 13.15603 | 70.87643 |
| 4.2                  | 85.7  | 2.24  | 13.44 | 13.62539 | 80.53768 |
| MALIC ACID           |       |       |       |          |          |
| 1:1 MA:RE (mol/mol)  |       |       |       |          |          |
| pH                   | L*    | a*    | b*    | C*       | h        |
| 1                    | 87.96 | 9.38  | 7.6   | 12.07246 | 39.01559 |
| 1.6                  | 88.38 | 8.66  | 7.69  | 11.58152 | 41.60478 |
| 2.2                  | 88.86 | 7.43  | 7.44  | 10.51468 | 45.03853 |
| 3                    | 88.79 | 6.5   | 7.39  | 9.841855 | 48.66621 |
| 4.2                  | 89.98 | 2.19  | 7.81  | 8.111239 | 74.33599 |
| 5:1 MA:RE (mol/mol)  |       |       |       |          |          |
| pH                   | L*    | a*    | b*    | C*       | h        |
| 1                    | 89.47 | 8.44  | 7.2   | 11.09385 | 40.46685 |
| 1.6                  | 89.2  | 8.08  | 7.46  | 10.99718 | 42.71528 |
| 2.2                  | 89.72 | 6.94  | 7.32  | 10.08692 | 46.52645 |
| 3                    | 89.35 | 6.29  | 7.4   | 9.71206  | 49.63546 |
| 4.2                  | 90.53 | 3.2   | 7.83  | 8.458658 | 67.77092 |

<sup>1</sup> Pigment concentration:  $4.5 \times 10^{-5}$  M calculated on mass basis as delphinidin

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 17. Cambios Colorimétricos de en las Antocianinas de Extractos de Jamaica <sup>(1)</sup> en un intento de Co-pigmentación con Ácido Clorogénico y Ácido Málico <sup>(2)</sup> en función del pH (1 a 4.2).**

<sup>(1)</sup> Extracto acuoso preparado a 100 °C/ 15 minutos.

<sup>(2)</sup> Proporciones de RE:CGA de 1:1 y 1:5 M, y de RE:MA de 1:1 y 1:5 respectivamente.

Todos los sistemas presentaron alta luminosidad ( $L^*$ ) y bajo croma ( $C^*$ ). Esta combinación de coordenadas CIELAB indica baja cromaticidad (el color blanco tiene unos valores respectivos de 100 y 0). Este efecto, también observado en los valores espectrofotométricos (baja absorbancia en la  $\lambda_{max}$  respectiva) es debido a la baja concentración de las soluciones. Los parámetros  $L^*$  y  $C^*$  dan una idea de como es percibida la intensidad del color (absorbancia) por los humanos.

La solución control presentó decremento en color con el incremento del pH. Esto, claramente no se observa en las soluciones co-pigmentadas ( ver también valores de absorbancias, Tabla V). Sin embargo, lejos de ser un efecto hiperocrómico (rojo más intenso que la solución original), este efecto se debió a un incremento de la opacidad y oscuridad de la solución. Es probable que ocurra una co-oxidación entre los co-pigmentos y algunos compuestos orgánicos presentes en el extracto, ocasionando los resultados observados. Un decremento en el valor de luminosidad ( $L^*$ ) ocurrió únicamente en los sistemas de ácido clorogénico y más notoriamente en la proporción de 5:1 CGA:RE, muy probablemente debido a alguna reacción oxidativa todavía no elucidada. Se podría obtener mayor estabilidad de estos sistemas mediante la utilización de concentraciones más bajas de ácido clorogénico (Tabla VI, Figura 17). Sin embargo, considerando todos los resultados a la vez, éstos nos indican claramente la necesidad de aislar a las antocianinas del extracto antes de proceder con la co-pigmentación. No obstante, la estabilización de los extractos completos quedaría como una propuesta interesante y atractiva.

## 5.0 CONCLUSIONES

- El mayor rendimiento de pigmento se obtuvo utilizando metanol a 65 °C por 15 minutos.
- El tiempo de extracción parece ser un factor importante en la degradación.
- Aunque la mayoría del pigmento se extrae con una proporción disolvente:soluto de 10:1, es necesario utilizar una proporción de 20:1 para obtener una recuperación completa de pigmento.
- El aislamiento y la purificación de las antocianinas se logró exitosamente mediante técnicas cromatográficas.
- Las antocianidinas presentes en la flor de jamaica son cianidina y delfinidina.
- El rendimiento total de pigmento fue de 1.2g por cada 100g de flor (base seca), del cual el 41% corresponde a cianidina y el 59% a delfinidina.
- Los azúcares presentes en ambas antocianinas fueron identificados como xilosa y glucosa. El contenido de éstos (0.37g de glucosa y 0.31g de xilosa por cada 100 g flor (base seca) para la fracción de delfinidina y 0.28g de glucosa y 0.23g de xilosa por cada 100 g de flor (base seca) para la fracción de cianidina) sugiere que los pigmentos son diglicósidos de cianidina y delfinidina conformados por una molécula de xilosa y otra de glucosa.
- Soluciones concentradas de antocianinas presentan el fenómeno de auto-asociación, incrementando el color hasta un 58% a temperatura ambiente. Bajo las condiciones probadas, el máximo aumento de color se da después de 12 horas de almacenamiento.
- No existe diferencia perceptible en la apariencia, sabor y resabio de una solución de jamaica diluida 58% con respecto a la original. Sin embargo, existe diferencia significativa en el aroma, específicamente en la frutalidad y la nota a té.
- La estabilización de color en el extracto no se logró con la utilización de ácido málico y ácido clorogénico como co-pigmentos.

## 6.0 TRABAJO FUTURO

- Escalar el rendimiento de pigmento mediante técnicas preparativas.
- Estudiar la estabilidad de los pigmentos aislados.
- Estabilizar las estructuras coloridas presentes en la Flor de jamaica

## 7.0 REFERENCIAS

- Agewall, S., Wright, S., Doughty, R.N., Whalley, G.A., Duxbury, M. y Sharpe, N.** 2000. *Does a Glass of Red Wine Improve Endothelial Function?* European Heart Journal, 21, 74.
- Alarcao-E-Silva, M.L.C.M.M., Leitao, A.E.B., Azinheira, H.G., Leitao, M.C.A.** 2001. *The Arbutus Berry: Studies on its Colour and Chemical Characteristics at Two Mature Stages.* Journal of Food Composition and Analysis., 14, 27.
- Archetti, M.** 2000. *The Origin of Autumn Colours by Coevolution.* Journal of Theoretical Biology., 205, 625.
- Asen, S.** 1976. *Known Factors Responsible for Infinite Flower Colour Variation.* Acta Horticulturae, 63, 217.
- Beattie, W. R.** 1937. *Production of Roselle.* U.S.D.A. Leaflet, 139.
- Brouillard, R. and Dubois, J. E.** 1977. *Mechanism of Structural Transformations of Anthocyanins in Acidic Media.* J. Am. Chem. Soc., 99, 1359.
- Brouillard, R. and Delaporte, B.** 1978. *Degradation Termique des Anthocyanin.* Bulletin de Liaison-Groupe Polyphenols, 8, 305.
- Brouillard, R.** 1982. *Chemical Structure of Anthocyanins,* In: *Anthocyanins as Food Colours.* P. Markakis (Ed.). Academic Press, London.
- Brouillard, R.** 1983. *The in Vivo Expression of Anthocyanin Colour in Plants.* Phytochem., 22, 1311.
- Camire, M.E.** 2002. *Blueberry and Grape Anthocyanins as Breakfast Cereal Colorants.* J. Fd. Sci., 67, 438.
- Chandler, B.V., Harper, K.A.** 1961. *Identification of Saccharides in Anthocyanins and Other Flavonoids.* Austral.J. Chem. 14, 586.
- Clydesdale, F. M., Main, J. H., and Francis, F. J.** 1987. *Cranberry Anthocyanins as Colorants for Beverages and Gelatin Desserts.* J. Fd. Prot., 42, 204.
- Crane, J. C.** 1949. *Roselle- a Potentially Important Plant Fibre.* J.Econ. Bot., 3,151.

**Du, C. T. and Francis, F. J.** 1973. *Anthocyanins of Roselle (Hibiscus sabdariffa)* J. Fd. Sci., 38, 810.

**Escribano-Bailón, T., Alvarez-García, M., Rivas-Gonzalo, J.C., Heredia, F.J. and Santos-Buelga, C.** 2001. *Color and Stability of Pigments Derived From The Acetaldehyde-Mediated Condensation Between Malvidin 3-O-Glucoside and (+)-Catechin.* J.Agric.Food Chem., 49, 1213.

**Esselen, W. B. and Sammy, G. M.** 1973. *Roselle- a Natural Red Colorant for Foods?* Fd. Prod. Dev., 7, 80,82,86.

**Fernandez-Lopez, J. A., Hidalgo, V., Almela, L. and Lopez-Roca, M.** 1992. *Quantitative Changes in Anthocyanins Pigments of Vitis vinifera cv Monastrell during Maturation.* J. Sci. Fd. Agric., 58, 153.

**Francis, F. J.** 1977. *Anthocyanins.* In: *Current Aspects of Food Colourants.* T.E. Furia (Ed.). CRC Press, Cleveland, OH., 19.

**Francis, F.J.** 1982. *Identification of Anthocyanins.* In: *Anthocyanins as Food Colours.* P., Markakis (Ed.). Academic Press, New York, 181.

**Francis, F. J.** 1984. *Future Trends.* In: *Developments in Food Colours-2.* J.Walford (Ed.). Applied Science Publishers, New York, 233.

**Gao, L. and Mazza, G.** 1994. *Rapid Method for Complete Chemical Characterization of Simple and Acylated Anthocyanins by High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Gas-Liquid Chromatography.* J. Agric. Food Chem., 42, 118.

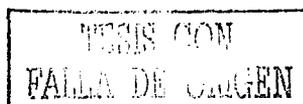
**Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J.M., Martínez-Casillas, Fernández-Fernández, J.I.** 2002. *Wine During Storage. Influence of Prefermentative Practices, Maceration Time and Storage.* Lebensm.-Wiss. u. Technol., 35, 46.

**Gonnet, J. F.** 1998. *Colour Effects of Co-pigmentation of Anthocyanins Revisited-1. A Colorimetric Definition using the CIELAB Scale.* Fd. Chem., 63, 409.

**Hale, M. L., Francis, F.J. and Fagerson, I.S.** 1986. *Detection of Enocyanin in Cranberry Juice Cocktail by HPLC Anthocyanin Profile.* J. Fd. Sci., 51, 1511.

**Harborne, J.B.** 1965. *In Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments.* Academic Press. New York, p.274.

**Harborne, J. B.** 1967. *Comparative Biochemistry of the Flavonoids.* Academic Press. New York.



**Harborne, J. B. and Dey, P.M.** 1989. *Methods in Plant Biochemistry*. In: Plant Phenolics. Academic Press. London.

**Harborne, J. B.** 1991. *The Handbook of Natural Flavonoids*. Volumen I and II. Ed. John Wiley & Sons.

**Haslam, E.** 1981. *Vegetable Tannins*. In: *The Biochemistry of Plants*. Academic Press. London, UK., 7, 327.

**Hrazdina, G.** 1974. *Reactions of Anthocyanins in Food Products*. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.*, 7, 193.

**Hrazdina, G. and Franzese, A. J.** 1974. *Reactions of Anthocyanins in Food Products*. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.*, 7, 103.

**Hyomi, M. and Miura, W.** 1992. *Hibiscus*. Koryo, 176,97.

**Ibrahim, M. E. H., Karamalla, K. A. and Khattab, A. G.** 1971. *Biochemical Studies on Kerkadi (Roselle) (Hibiscus sabdariffa)*. *Sud. J. Fd. Sci.*, 3, 37.

**Kaneira, T., Saito, K.** 2001. *Stability of Carthamin and Safflor Yellow B on Silk Powders Under Continuous Irradiation of Fluorescent or UV-C Light*. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.*, 34, 55.

**Lancrenon, X.** 1978. *Recent Trends in the Manufacturing of Natural Red Colours*. *Process Biochem.*, 13,16.

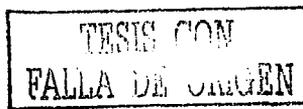
**Lawless, H. T., Corrigan C. J., and Lee, C. B.** 1994. *Interaction of Astringent Substances*. *Chem. Senses*, 19, 141.

**Lee, C. B. and Lawless, H. T.** 1991. *Time-course of Astringent Sensations*. *Chem. Senses*, 16, 225.

**Lev-Yadun, S.** 2001. *Apostematic (Warning) Coloration Associated With Thorns in Higher Plants*. *Journal of Theoretical Biology.*, 210, 385.

**Markakis, P., Livingston, G. E. and Fellers, C. R.** 1957. *Quantitative Aspects of Strawberry Pigment Degradation*. *Fd. Res.*, 22, 117.

**Markakis, P.** 1974. *Anthocyanins and their Stability In: Foods*. *CRC crit. Rev. Fd. Technol.*, 4, 437.



- Markham, K. R.** 1982. *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, New York.
- Mazza, G.** 1986. *Anthocyanins and Other Phenolic Compounds of Saskatoon Berries (Amelanchier alnifolia Nutt.)*. J. Fd. Sci., 51, 1260.
- Mazza, G. and Brouillard, R.** 1990. *The Mechanism of Co-pigmentation of Anthocyanins in Aqueous Solutions*. Phytochem., 29, 1097-2001.
- Mazza, G. and Miniati, E.** 1993. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*. CRC Press, London.
- McDougall, D.**(1988). *Colour Vision and Appearance Measurement*. In: *Sensory Analysis of Food*. Ed. J.R. Piggott. 2<sup>nd</sup> ed. Elsevier Science Publications Ltd. Barking Essex, U.K., p. 103.
- Meggos, H. N.** 1984. *Color-Key Food Ingredients*. Food Technol., 38, 70.
- Mueller, B. M., Franz, G.** 1992. *Chemical Structure and Biological Activity of Polysaccharides from Hibiscus sabdariffa*. Planta Medica, 58, 60.
- Peterson, J., Dwyer, J.** 2000. *An Informatics Approach to Flavonoid Database Development*. Journal of Food Composition and Analysis, 13, 441.
- Pouget, M. P, Vennat, B. and Pourrat, A.** 1990. *Identification of Anthocyanins of Hibiscus sabdariffa*. Lebensm.Wiss u technol., 23, 101.
- Ribereau-Gayon, P., Pontallier, P., and Glories, Y.** 1983. *Some Interpretation of Colour Changes in Young Red Wines During Their Conservation*, J. Sci. Food Agric., 34, 505.
- Robinson, G. M., and Robinson, R.** 1931. *A Survey of Anthocyanins*. Biochem. J., 25-II, 1687.
- Rubico, S. M. and McDaniel, M. R.** 1992. *Sensory Evaluation of Acids by Free Choice Profiling*. Chem. Senses, 17, 273.
- Sears, F.W.** 1960. *Fundamentos de Física III-Optica*. Editorial Aguilar. Madrid, p.325
- Siliha, H. and Askar, A.** 1987. *Determination of Sugars in Carob, Roselle and Tamarind*. Alimenta, 26, 127.
- Somers, T.C.** 1971 *The Polymeric Nature of Wine Pigments*, Phytochem., 10, 2175.

**Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita, M. and Wells, W.W.** 1963. *Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugars and Related Substances*. J. Am. Chem. Soc., 85, 2497.

**Taylor S., Feild, S.** 2001. Why Leaves Turn Red in Autumn. The Role of Anthocyanins in Senescing Leaves of Red-osier Dogwood. *Plant Phys.*, 127, 566.

**Timberlake, C.F. and Bridle, P.** 1975. *In The Flavonoids*. Chapman and Hall, London., p.214.

**Timberlake, C.F.** 1980. *Anthocyanins-Occurrence, Extraction and Chemistry*. *Fd. Chem.*, 5, 69.

**Wester, P. J.** 1911. *Contributions to the History and Bibliography of the Roselle*. Torrey Bot. Club. Bull., 38, 91.

**Wilkinson, M., Sweeny, J. G. and Iacobucci, A.** 1977. *High-Pressure Liquid Chromatography of Anthocyanins*. *J. Chrom.*, 132.

**Winton, L. A. and Winton, B. K.** 1935. *The Structure and Composition of Foods*. John Wiley & Sons, Inc. London, 2, 771.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# ANEXO I

## APARIENCIA

### Univariate Analysis

#### General Linear Model: thickness, opacity, ... versus Equilibrated, Sugar, ...

| Factor             | Type  | Levels | Values                           |
|--------------------|-------|--------|----------------------------------|
| Equilibr           | fixed | 2      | NO YES                           |
| Concentr(Equilibr) | fixed | 3      | LOW HIGH LOW                     |
| Sugar              | fixed | 2      | NO YES                           |
| Panelist           | fixed | 14     | 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 |

#### Analysis of Variance for thickness, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F    | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 11.166  | 11.166  | 11.166 | 4.22 | 0.049 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.239   | 0.239   | 0.239  | 0.09 | 0.765 |
| Sugar                    | 1  | 1.733   | 2.093   | 2.093  | 0.79 | 0.377 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 0.381   | 0.381   | 0.381  | 0.14 | 0.705 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.419   | 0.419   | 0.419  | 0.16 | 0.692 |
| Panelist                 | 13 | 107.517 | 107.517 | 8.271  | 3.13 | 0.001 |
| Error                    | 65 | 171.850 | 171.850 | 2.644  |      |       |
| Total                    | 83 | 293.305 |         |        |      |       |

#### Analysis of Variance for opacity, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F    | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 2.816   | 2.816   | 2.816  | 1.40 | 0.240 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.513   | 0.513   | 0.513  | 0.26 | 0.615 |
| Sugar                    | 1  | 0.000   | 0.001   | 0.001  | 0.00 | 0.982 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 0.004   | 0.004   | 0.004  | 0.00 | 0.964 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 2.142   | 2.142   | 2.142  | 1.07 | 0.305 |
| Panelist                 | 13 | 242.732 | 242.732 | 18.672 | 9.31 | 0.000 |
| Error                    | 65 | 130.292 | 130.292 | 2.004  |      |       |
| Total                    | 83 | 378.499 |         |        |      |       |

#### Analysis of Variance for lightness, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F    | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 8.482   | 8.482   | 8.482  | 1.71 | 0.200 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.932   | 0.932   | 0.932  | 0.63 | 0.431 |
| Sugar                    | 1  | 6.288   | 4.069   | 4.069  | 2.74 | 0.103 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 1.084   | 1.084   | 1.084  | 0.73 | 0.396 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.323   | 0.323   | 0.323  | 0.22 | 0.643 |
| Panelist                 | 13 | 167.773 | 167.773 | 12.906 | 8.68 | 0.000 |
| Error                    | 65 | 96.625  | 96.625  | 1.487  |      |       |
| Total                    | 83 | 281.507 |         |        |      |       |

Analysis of Variance for orange\_r, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F    | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 1.688   | 1.688   | 1.688  | 0.85 | 0.360 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 2.463   | 2.463   | 2.463  | 1.24 | 0.270 |
| Sugar                    | 1  | 0.084   | 0.002   | 0.002  | 0.00 | 0.977 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 0.491   | 0.491   | 0.491  | 0.25 | 0.621 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.111   | 0.111   | 0.111  | 0.06 | 0.814 |
| Panelist                 | 13 | 214.077 | 214.077 | 16.467 | 8.29 | 0.000 |
| Error                    | 65 | 129.185 | 129.185 | 1.987  |      |       |
| Total                    | 83 | 348.100 |         |        |      |       |

Analysis of Variance for red\_pink, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F    | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 0.046   | 0.046   | 0.046  | 0.03 | 0.875 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.000   | 0.000   | 0.000  | 0.00 | 0.990 |
| Sugar                    | 1  | 1.191   | 1.740   | 1.740  | 0.94 | 0.335 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 0.758   | 0.758   | 0.758  | 0.41 | 0.524 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 2.100   | 2.100   | 2.100  | 1.14 | 0.290 |
| Panelist                 | 13 | 238.899 | 238.899 | 18.377 | 9.94 | 0.000 |
| Error                    | 65 | 120.124 | 120.124 | 1.848  |      |       |
| Total                    | 83 | 363.118 |         |        |      |       |

Analysis of Variance for pink\_pur, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F    | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 3.841   | 3.841   | 3.841  | 1.19 | 0.280 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.013   | 0.013   | 0.013  | 0.00 | 0.950 |
| Sugar                    | 1  | 0.289   | 0.000   | 0.000  | 0.00 | 0.993 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 2.447   | 2.447   | 2.447  | 0.76 | 0.388 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.081   | 0.081   | 0.081  | 0.03 | 0.875 |
| Panelist                 | 13 | 337.084 | 337.084 | 25.930 | 8.02 | 0.000 |
| Error                    | 65 | 210.244 | 210.244 | 3.235  |      |       |
| Total                    | 83 | 553.999 |         |        |      |       |

Analysis of Variance for brown ti, using Adjusted SS for Tests

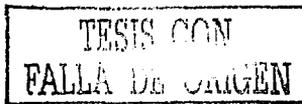
| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F    | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 0.939   | 0.939   | 0.939  | 0.48 | 0.491 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.327   | 0.327   | 0.327  | 0.17 | 0.684 |
| Sugar                    | 1  | 2.009   | 2.088   | 2.088  | 1.07 | 0.306 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 0.106   | 0.106   | 0.106  | 0.05 | 0.817 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.792   | 0.792   | 0.792  | 0.40 | 0.527 |
| Panelist                 | 13 | 182.314 | 182.314 | 14.024 | 7.16 | 0.000 |
| Error                    | 65 | 127.319 | 127.319 | 1.959  |      |       |
| Total                    | 83 | 313.806 |         |        |      |       |

**Multivariate Analysis**

**General Linear Model: thickness, opacity, ... versus Equilibrated, Sugar, ...**

MANOVA for Wilk's test for APPEARANCE

| Criterion          | Test Statistic | F     | DF       | P     |
|--------------------|----------------|-------|----------|-------|
| Equilibrated       | 0.84603        | 1.534 | ( 7, 59) | 0.174 |
| Concentr(Equilibr) | 0.96972        | 0.263 | ( 7, 59) | 0.966 |
| Sugar              | 0.90472        | 0.888 | ( 7, 59) | 0.522 |
| Equilibr*Sugar     | 0.94052        | 0.533 | ( 7, 59) | 0.806 |



|                          |         |       |       |      |       |
|--------------------------|---------|-------|-------|------|-------|
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 0.90102 | 0.926 | ( 7,  | 59)  | 0.493 |
| Panelist                 | 0.00155 | 7.540 | ( 91, | 376) | 0.000 |

## AROMA

### General Linear Model: fruitiness, flower like, ... versus Equilibrated, Sugar, .

| Factor             | Type  | Levels | Values                           |
|--------------------|-------|--------|----------------------------------|
| Equilibr           | fixed | 2      | NO YES                           |
| Concentr(Equilibr) | fixed | 3      | LOW HIGH LOW                     |
| Sugar              | fixed | 2      | NO YES                           |
| Panelist           | fixed | 14     | 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 |

#### Analysis of Variance for fruitine, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F     | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|-------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 36.515  | 36.515  | 36.515 | 16.62 | 0.000 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 1.901   | 1.901   | 1.901  | 0.87  | 0.356 |
| Sugar                    | 1  | 0.906   | 0.972   | 0.972  | 0.44  | 0.508 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 0.071   | 0.071   | 0.071  | 0.03  | 0.858 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 1.231   | 1.231   | 1.231  | 0.56  | 0.457 |
| Panelist                 | 13 | 170.846 | 170.846 | 13.142 | 5.98  | 0.000 |
| Error                    | 65 | 142.775 | 142.775 | 2.197  |       |       |
| Total                    | 83 | 354.245 |         |        |       |       |

#### Analysis of Variance for flower 1, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F    | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 4.949   | 4.949   | 4.949  | 2.11 | 0.151 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 3.709   | 3.709   | 3.709  | 1.58 | 0.213 |
| Sugar                    | 1  | 1.769   | 1.338   | 1.338  | 0.57 | 0.452 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 0.085   | 0.085   | 0.085  | 0.04 | 0.850 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 2.602   | 2.602   | 2.602  | 1.11 | 0.296 |
| Panelist                 | 13 | 120.513 | 120.513 | 9.270  | 3.96 | 0.000 |
| Error                    | 65 | 152.242 | 152.242 | 2.342  |      |       |
| Total                    | 83 | 285.868 |         |        |      |       |

#### Analysis of Variance for tea like, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F    | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 17.870  | 17.870  | 17.870 | 5.39 | 0.023 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 5.446   | 5.446   | 5.446  | 1.64 | 0.204 |
| Sugar                    | 1  | 13.416  | 17.632  | 17.632 | 5.32 | 0.024 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 5.006   | 5.006   | 5.006  | 1.51 | 0.223 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.144   | 0.144   | 0.144  | 0.04 | 0.836 |
| Panelist                 | 13 | 305.303 | 305.303 | 23.485 | 7.09 | 0.000 |
| Error                    | 65 | 215.349 | 215.349 | 3.313  |      |       |
| Total                    | 83 | 562.533 |         |        |      |       |

Analysis of Variance for sourness, using Adjusted SS for Tests

| Source                    | DF | Seq SS  | Adj SS | Adj MS | F    | P     |
|---------------------------|----|---------|--------|--------|------|-------|
| Equilibr                  | 1  | 3.567   | 3.567  | 3.567  | 2.45 | 0.122 |
| Concentr (Equilibr)       | 1  | 3.787   | 3.787  | 3.787  | 2.61 | 0.111 |
| Sugar                     | 1  | 1.468   | 1.216  | 1.216  | 0.84 | 0.364 |
| Equilibr*Sugar            | 1  | 0.014   | 0.014  | 0.014  | 0.01 | 0.922 |
| Sugar*Concentr (Equilibr) | 1  | 0.220   | 0.220  | 0.220  | 0.15 | 0.698 |
| Panelist                  | 13 | 46.949  | 46.949 | 3.611  | 2.48 | 0.008 |
| Error                     | 65 | 94.477  | 94.477 | 1.453  |      |       |
| Total                     | 83 | 150.483 |        |        |      |       |

Analysis of Variance for sweetness, using Adjusted SS for Tests

| Source                    | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F    | P     |
|---------------------------|----|---------|---------|--------|------|-------|
| Equilibr                  | 1  | 0.017   | 0.017   | 0.017  | 0.01 | 0.922 |
| Concentr (Equilibr)       | 1  | 3.115   | 3.115   | 3.115  | 1.74 | 0.192 |
| Sugar                     | 1  | 10.214  | 11.273  | 11.273 | 6.28 | 0.015 |
| Equilibr*Sugar            | 1  | 1.067   | 1.067   | 1.067  | 0.60 | 0.443 |
| Sugar*Concentr (Equilibr) | 1  | 1.797   | 1.797   | 1.797  | 1.00 | 0.321 |
| Panelist                  | 13 | 125.629 | 125.629 | 9.664  | 5.39 | 0.000 |
| Error                     | 65 | 116.599 | 116.599 | 1.794  |      |       |
| Total                     | 83 | 258.438 |         |        |      |       |

**Multivariate Analysis**

**General Linear Model: fruitiness, flower like, ... versus Equilibrated, Sugar, .**

MANOVA for Wilk's test for AROMA

| Criterion                 | Test Statistic | F     | DF         | P     |
|---------------------------|----------------|-------|------------|-------|
| Equilibrated              | 0.61152        | 7.750 | ( 5, 61)   | 0.000 |
| Concentr (Equilibr)       | 0.93863        | 0.798 | ( 5, 61)   | 0.556 |
| Sugar                     | 0.83492        | 2.412 | ( 5, 61)   | 0.046 |
| Equilibr*Sugar            | 0.96486        | 0.444 | ( 5, 61)   | 0.816 |
| Sugar*Concentr (Equilibr) | 0.96447        | 0.449 | ( 5, 61)   | 0.812 |
| Panelist                  | 0.04890        | 4.018 | ( 65, 292) | 0.000 |

**Tabulated Statistics: Equilibrated**

Rows: Equilibr

|     | fruitine<br>Mean | tea like<br>Mean |
|-----|------------------|------------------|
| NO  | 2.9511           | 3.2588           |
| YES | 1.5525           | 2.2804           |

**Correlations: fruitiness, flower like, tea like, sourness, sweetness**

|          |                |                |                |                |
|----------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|          | fruitine       | flower l       | tea like       | sourness       |
| flower l | 0.722<br>0.000 |                |                |                |
| tea like | 0.427<br>0.000 | 0.521<br>0.000 |                |                |
| sourness | 0.329<br>0.002 | 0.324<br>0.003 | 0.331<br>0.002 |                |
| sweetnes | 0.409<br>0.000 | 0.491<br>0.000 | 0.589<br>0.000 | 0.366<br>0.001 |

**SABOR**

**General Linear Model: sweet flavou, sour flavour, ... versus Equilibrated, Sugar**

| Factor             | Type  | Levels | Values                           |
|--------------------|-------|--------|----------------------------------|
| Equilibr           | fixed | 2      | NO YES                           |
| Concentr(Equilibr) | fixed | 3      | LOW HIGH LOW                     |
| Sugar              | fixed | 2      | NO YES                           |
| Panelist           | fixed | 14     | 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 |

**Analysis of Variance for sweet fl, using Adjusted SS for Tests**

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS  | F      | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|---------|--------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 0.137   | 0.137   | 0.137   | 0.11   | 0.743 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.002   | 0.002   | 0.002   | 0.00   | 0.972 |
| Sugar                    | 1  | 547.951 | 487.805 | 487.805 | 386.55 | 0.000 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 0.003   | 0.003   | 0.003   | 0.00   | 0.965 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.238   | 0.238   | 0.238   | 0.19   | 0.666 |
| Panelist                 | 13 | 51.322  | 51.322  | 3.948   | 3.13   | 0.001 |
| Error                    | 65 | 82.027  | 82.027  | 1.262   |        |       |
| Total                    | 83 | 681.679 |         |         |        |       |

**Analysis of Variance for sour fla, using Adjusted SS for Tests**

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS  | F     | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|---------|-------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 0.040   | 0.040   | 0.040   | 0.02  | 0.898 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.225   | 0.225   | 0.225   | 0.09  | 0.760 |
| Sugar                    | 1  | 230.414 | 219.881 | 219.881 | 91.85 | 0.000 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 2.407   | 2.407   | 2.407   | 1.01  | 0.320 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 2.808   | 2.808   | 2.808   | 1.17  | 0.283 |
| Panelist                 | 13 | 284.769 | 284.769 | 21.905  | 9.15  | 0.000 |
| Error                    | 65 | 155.602 | 155.602 | 2.394   |       |       |
| Total                    | 83 | 676.265 |         |         |       |       |

Analysis of Variance for flower f, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F    | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 2.599   | 2.599   | 2.599  | 1.09 | 0.301 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.971   | 0.971   | 0.971  | 0.41 | 0.526 |
| Sugar                    | 1  | 21.985  | 19.310  | 19.310 | 8.06 | 0.006 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 0.006   | 0.006   | 0.006  | 0.00 | 0.959 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.011   | 0.011   | 0.011  | 0.00 | 0.946 |
| Panelist                 | 13 | 166.601 | 166.601 | 12.815 | 5.35 | 0.000 |
| Error                    | 65 | 155.633 | 155.633 | 2.394  |      |       |
| Total                    | 83 | 347.806 |         |        |      |       |

Analysis of Variance for astrinige, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F    | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 3.006   | 3.006   | 3.006  | 0.94 | 0.336 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 4.430   | 4.430   | 4.430  | 1.39 | 0.243 |
| Sugar                    | 1  | 38.515  | 29.735  | 29.735 | 9.31 | 0.003 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 1.427   | 1.427   | 1.427  | 0.45 | 0.506 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.522   | 0.522   | 0.522  | 0.16 | 0.687 |
| Panelist                 | 13 | 144.169 | 144.169 | 11.090 | 3.47 | 0.000 |
| Error                    | 65 | 207.705 | 207.705 | 3.195  |      |       |
| Total                    | 83 | 399.773 |         |        |      |       |

Analysis of Variance for fruit fl, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F     | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|-------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 1.143   | 1.143   | 1.143  | 0.35  | 0.556 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 2.770   | 2.770   | 2.770  | 0.85  | 0.360 |
| Sugar                    | 1  | 49.725  | 43.404  | 43.404 | 13.32 | 0.001 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 0.033   | 0.033   | 0.033  | 0.01  | 0.921 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 1.190   | 1.190   | 1.190  | 0.37  | 0.548 |
| Panelist                 | 13 | 208.690 | 208.690 | 16.053 | 4.93  | 0.000 |
| Error                    | 65 | 211.831 | 211.831 | 3.259  |       |       |
| Total                    | 83 | 475.382 |         |        |       |       |

Analysis of Variance for tea flav, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F    | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 1.649   | 1.649   | 1.649  | 0.59 | 0.447 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.407   | 0.407   | 0.407  | 0.14 | 0.705 |
| Sugar                    | 1  | 4.040   | 5.838   | 5.838  | 2.07 | 0.155 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 2.445   | 2.445   | 2.445  | 0.87 | 0.355 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.115   | 0.115   | 0.115  | 0.04 | 0.840 |
| Panelist                 | 13 | 276.284 | 276.284 | 21.253 | 7.55 | 0.000 |
| Error                    | 65 | 183.053 | 183.053 | 2.816  |      |       |
| Total                    | 83 | 467.993 |         |        |      |       |

Analysis of Variance for refreshi, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F     | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|-------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 0.078   | 0.078   | 0.078  | 0.05  | 0.829 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.075   | 0.075   | 0.075  | 0.05  | 0.832 |
| Sugar                    | 1  | 48.478  | 36.349  | 36.349 | 21.93 | 0.000 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 2.580   | 2.580   | 2.580  | 1.56  | 0.217 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.864   | 0.864   | 0.864  | 0.52  | 0.473 |
| Panelist                 | 13 | 105.563 | 105.563 | 8.120  | 4.90  | 0.000 |
| Error                    | 65 | 107.744 | 107.744 | 1.658  |       |       |
| Total                    | 83 | 265.381 |         |        |       |       |

Analysis of Variance for mouthwat, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F    | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 0.025   | 0.025   | 0.025  | 0.01 | 0.925 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.035   | 0.035   | 0.035  | 0.01 | 0.912 |
| Sugar                    | 1  | 0.695   | 0.278   | 0.278  | 0.10 | 0.756 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 0.601   | 0.601   | 0.601  | 0.21 | 0.647 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.129   | 0.129   | 0.129  | 0.05 | 0.832 |
| Panelist                 | 13 | 197.987 | 197.987 | 15.230 | 5.35 | 0.000 |
| Error                    | 65 | 185.047 | 185.047 | 2.847  |      |       |
| Total                    | 83 | 384.518 |         |        |      |       |

Analysis of Variance for metallic, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F     | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|-------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 2.345   | 2.345   | 2.345  | 1.03  | 0.313 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.044   | 0.044   | 0.044  | 0.02  | 0.890 |
| Sugar                    | 1  | 76.827  | 76.283  | 76.283 | 33.61 | 0.000 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 1.990   | 1.990   | 1.990  | 0.88  | 0.353 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.400   | 0.400   | 0.400  | 0.18  | 0.676 |
| Panelist                 | 13 | 257.601 | 257.601 | 19.815 | 8.73  | 0.000 |
| Error                    | 65 | 147.537 | 147.537 | 2.270  |       |       |
| Total                    | 83 | 486.744 |         |        |       |       |

**General Linear Model: sweet flavou, sour flavou, ... versus Equilibrated, Sugar**

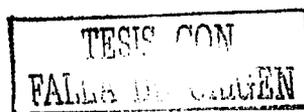
MANOVA for Wilk's test for FLAVOUR

| Criterion                | Test Statistic | F      | DF         | P     |
|--------------------------|----------------|--------|------------|-------|
| Equilibrated             | 0.89211        | 0.766  | ( 9, 57)   | 0.648 |
| Concentr(Equilibr)       | 0.95931        | 0.269  | ( 9, 57)   | 0.981 |
| Sugar                    | 0.08625        | 67.093 | ( 9, 57)   | 0.000 |
| Equilibr*Sugar           | 0.92242        | 0.533  | ( 9, 57)   | 0.845 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 0.93648        | 0.430  | ( 9, 57)   | 0.914 |
| Panelist                 | 0.00095        | 5.777  | (117, 439) | 0.000 |

**RESABIO**

**General Linear Model: sweet after, sour after, ... versus Equilibrated, Sugar, .**

| Factor             | Type  | Levels | Values                           |
|--------------------|-------|--------|----------------------------------|
| Equilibr           | fixed | 2      | NO YES                           |
| Concentr(Equilibr) | fixed | 3      | LOW HIGH LOW                     |
| Sugar              | fixed | 2      | NO YES                           |
| Panelist           | fixed | 14     | 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 |



Analysis of Variance for sweet af, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS  | F      | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|---------|--------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 1.514   | 1.514   | 1.514   | 0.55   | 0.461 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.001   | 0.001   | 0.001   | 0.00   | 0.987 |
| Sugar                    | 1  | 319.670 | 287.272 | 287.272 | 104.42 | 0.000 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 0.077   | 0.077   | 0.077   | 0.03   | 0.868 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.006   | 0.006   | 0.006   | 0.00   | 0.964 |
| Panelist                 | 13 | 124.068 | 124.068 | 9.544   | 3.47   | 0.000 |
| Error                    | 65 | 178.822 | 178.822 | 2.751   |        |       |
| Total                    | 83 | 624.156 |         |         |        |       |

Analysis of Variance for sour aft, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS  | F     | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|---------|-------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 0.000   | 0.000   | 0.000   | 0.00  | 1.000 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 2.100   | 2.100   | 2.100   | 0.68  | 0.411 |
| Sugar                    | 1  | 263.028 | 251.569 | 251.569 | 81.87 | 0.000 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 2.928   | 2.928   | 2.928   | 0.95  | 0.333 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.692   | 0.692   | 0.692   | 0.23  | 0.637 |
| Panelist                 | 13 | 147.121 | 147.121 | 11.317  | 3.68  | 0.000 |
| Error                    | 65 | 199.741 | 199.741 | 3.073   |       |       |
| Total                    | 83 | 615.609 |         |         |       |       |

Analysis of Variance for bitterne, using Adjusted SS for Tests

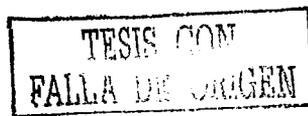
| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F     | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|-------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 0.180   | 0.180   | 0.180  | 0.06  | 0.802 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.161   | 0.161   | 0.161  | 0.06  | 0.812 |
| Sugar                    | 1  | 99.045  | 87.421  | 87.421 | 30.83 | 0.000 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 0.010   | 0.010   | 0.010  | 0.00  | 0.953 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 1.186   | 1.186   | 1.186  | 0.42  | 0.520 |
| Panelist                 | 13 | 197.282 | 197.282 | 15.176 | 5.35  | 0.000 |
| Error                    | 65 | 184.325 | 184.325 | 2.836  |       |       |
| Total                    | 83 | 482.189 |         |        |       |       |

Analysis of Variance for astring\_, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F     | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|-------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 1.803   | 1.803   | 1.803  | 0.60  | 0.440 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.028   | 0.028   | 0.028  | 0.01  | 0.923 |
| Sugar                    | 1  | 76.498  | 59.792  | 59.792 | 20.01 | 0.000 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 2.374   | 2.374   | 2.374  | 0.79  | 0.376 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.180   | 0.180   | 0.180  | 0.06  | 0.807 |
| Panelist                 | 13 | 305.934 | 305.934 | 23.533 | 7.87  | 0.000 |
| Error                    | 65 | 194.254 | 194.254 | 2.989  |       |       |
| Total                    | 83 | 581.071 |         |        |       |       |

Analysis of Variance for fruit\_af, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F    | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 0.000   | 0.000   | 0.000  | 0.00 | 0.995 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.042   | 0.042   | 0.042  | 0.02 | 0.886 |
| Sugar                    | 1  | 16.331  | 17.806  | 17.806 | 8.84 | 0.004 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 1.510   | 1.510   | 1.510  | 0.75 | 0.390 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.784   | 0.784   | 0.784  | 0.39 | 0.535 |
| Panelist                 | 13 | 242.128 | 242.128 | 18.625 | 9.25 | 0.000 |
| Error                    | 65 | 130.855 | 130.855 | 2.013  |      |       |
| Total                    | 83 | 391.650 |         |        |      |       |



Analysis of Variance for refresh\_, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F     | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|-------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 1.175   | 1.175   | 1.175  | 0.56  | 0.458 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.004   | 0.004   | 0.004  | 0.00  | 0.965 |
| Sugar                    | 1  | 23.319  | 21.356  | 21.356 | 10.13 | 0.002 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 0.042   | 0.042   | 0.042  | 0.02  | 0.888 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 2.314   | 2.314   | 2.314  | 1.10  | 0.299 |
| Panelist                 | 13 | 165.214 | 165.214 | 12.709 | 6.03  | 0.000 |
| Error                    | 65 | 137.020 | 137.020 | 2.108  |       |       |
| Total                    | 83 | 329.089 |         |        |       |       |

Analysis of Variance for mouthwat, using Adjusted SS for Tests

| Source                   | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS | F    | P     |
|--------------------------|----|---------|---------|--------|------|-------|
| Equilibr                 | 1  | 0.222   | 0.222   | 0.222  | 0.08 | 0.773 |
| Concentr(Equilibr)       | 1  | 0.571   | 0.571   | 0.571  | 0.22 | 0.644 |
| Sugar                    | 1  | 4.755   | 6.593   | 6.593  | 2.49 | 0.119 |
| Equilibr*Sugar           | 1  | 2.357   | 2.357   | 2.357  | 0.89 | 0.349 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 1  | 0.098   | 0.098   | 0.098  | 0.04 | 0.848 |
| Panelist                 | 13 | 125.355 | 125.355 | 9.643  | 3.64 | 0.000 |
| Error                    | 65 | 172.011 | 172.011 | 2.646  |      |       |
| Total                    | 83 | 305.369 |         |        |      |       |

**General Linear Model: sweet after, sour after, ... versus Equilibrated, Sugar, .**

MANOVA for Wilk's test for AFTER TASTE

| Criterion                | Test Statistic | F      | DF         | P     |
|--------------------------|----------------|--------|------------|-------|
| Equilibrated             | 0.96635        | 0.293  | ( 7, 59)   | 0.954 |
| Concentr(Equilibr)       | 0.97758        | 0.193  | ( 7, 59)   | 0.986 |
| Sugar                    | 0.20270        | 33.152 | ( 7, 59)   | 0.000 |
| Equilibr*Sugar           | 0.88629        | 1.081  | ( 7, 59)   | 0.387 |
| Sugar*Concentr(Equilibr) | 0.96468        | 0.309  | ( 7, 59)   | 0.947 |
| Panelist                 | 0.01067        | 4.431  | ( 91, 376) | 0.000 |

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANEXO II

### Información Derivada del Análisis Cromatográfico de Líquidos de Alta Eficiencia

| AGLICONAS               |                 |               |                          |  |
|-------------------------|-----------------|---------------|--------------------------|--|
|                         | t ret.<br>(min) | Área<br>(mAu) | Concentración<br>(mg/ml) | Rendimiento<br>(g/100g flor<br>(b.s.)) |
| Delfinidina             | 30.557          | 5800.0129     | 0.0830                   | 0.71                                   |
| Cianidina               | 38.409          | 2756.6861     | 0.049                    | 0.505                                  |
| Delfinidina<br>estándar | 30.552          | 279.27414     | 0.04                     | -----                                  |
| Cianidina<br>estándar   | 38.402          | 280.34102     | 0.05                     | -----                                  |

Para este análisis se extrajeron 5 g de flor de jamaica con 50 ml de metanol (sección 3.2.2). Al final de la extracción, el volumen se redujo a 24 ml. De esta solución, se aplicaron 1.2 ml a una TLC (sección 3.2.2.1) y las antocianinas obtenidas se hidrolizaron (sección 3.2.3.2) para su posterior análisis en HPLC (sección 3.2.3.3.2).

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

TESIS CON  
FALLA EN EL PROCESO

## ANEXO III

### Información Derivada del Análisis Cromatográfico de Gases

|                     | FRACCIÓN HIDROLIZADA DE DELFINIDINA |               |                       |                                  | FRACCIÓN HIDROLIZADA DE CIANIDINA |               |                       |                                  |
|---------------------|-------------------------------------|---------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---------------|-----------------------|----------------------------------|
|                     | t ret. (min)                        | Área (Counts) | Concentración (mg/ml) | Rendimiento (g/100g flor (b.s.)) | t ret. (min)                      | Área (Counts) | Concentración (mg/ml) | Rendimiento (g/100g flor (b.s.)) |
| Glucosa             | 7.383                               | 12333874.5    | 0.875                 | 0.37                             | 7.336                             | 9274535.47    | 0.6584                | 0.28                             |
| Xilosa              | 4.891                               | 6853368.849   | 0.363                 | -----                            | 4.879                             | 5152519.704   | 0.2730                | -----                            |
|                     | 5.169                               | 4028371.051   | 0.255                 | -----                            | 5.152                             | 3630079.968   | 0.1923942             | -----                            |
|                     | 5.498                               | 2069301.878   | 0.109                 | -----                            | 5.475                             | 1555748.557   | 0.082454              | -----                            |
| <b>TOTAL xilosa</b> | -----                               | 13751041.77   | 0.7288                | 0.31                             | -----                             | 10338348.22   | 0.5479317             | 0.23                             |

| ESTÁNDARES          |              |               |                       |
|---------------------|--------------|---------------|-----------------------|
|                     | t ret. (min) | Área (Counts) | Concentración (mg/ml) |
| Glucosa estándar    | 7.331        | 116017000     | 0.00833               |
| Xilosa estándar     | 4.851        | 77344666.65   | -----                 |
|                     | 5.124        | 54491266.65   | -----                 |
|                     | 5.464        | 23353399.99   | -----                 |
| <b>TOTAL xilosa</b> | -----        | 155189333.3   | 0.00833               |

Las diluciones que se realizaron en el análisis fueron las siguientes:

Se extrajeron 5 g de flor de jamaica con 50 ml de metanol (sección 3.2.2), se redujo a un volumen de 24 ml y se aplicaron 1.2 ml de la solución en TLC (sección 3.2.2.1), se recuperó, se realizó la hidrólisis ácida (sección 3.2.3.2) y se evaporó el solvente a sequedad. Se agregaron 0.5 ml de piridina y 0.1 ml de reactivos para la sililación (sección 3.2.3.4.2). Se inyectó 1 µl en el cromatógrafo de gases.

La reacción de sililación tiene un rendimiento del 90% (Sweeley et al., 1963)