



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS VÍA ENZIMÁTICA**

*TRABAJO ESCRITO VÍA CURSOS DE EDUCACIÓN  
CONTINUA*

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A:**

**PAOLA SAN LUIS LEÓN**

**CDMX 2021**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Bárzana García Eduardo

**VOCAL:** Profesor: Navarro Ocaña Arturo

**SECRETARIO:** Profesor: Montiel Pacheco Carmina

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Fonseca Larios Rodolfo

**2° SUPLENTE:** Profesor: Ocampo Hurtado Ana Laura

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

### **ASESOR DEL TEMA:**

Doctora: Carmina Montiel Pacheco

### **SUSTENTANTE (S):**

Paola San Luis León



## Índice

<b>Capítulo 1: Los colorantes: Antecedentes, clasificación y diferenciación</b>	<b>11</b>
1.1 Antecedentes Históricos	11
1.2 Colorantes Sintéticos	13
1.3 Colorantes Naturales	14
1.3.1 ANTOCIANINAS	15
1.3.2 PRODUCCIÓN ANUAL DE ANTOCIANINAS	24
<b>Capítulo 2: Métodos de extracción</b>	<b>27</b>
2.1 Extracción con solventes	27
2.2 Extracción asistida con microondas	29
2.3 Extracción con ultrasonido	31
2.4 Extracción asistida por enzimas	32
2.5 Determinación de la concentración	33
2.6 Cromatografía Líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-ESI-MS)	34
a) Actividad y capacidad antioxidante	35
b) Mecanismo antioxidantes en el cuerpo	41
<b>Capítulo 3: Jamaica</b>	<b>43</b>
3.1 Antecedentes	43
3.2 Composición química de la flor de jamaica	44
3.3 Localización de antocianinas en la pared celular	52
3.3.1 Propiedades fisicoquímicas y composición proximal de la pared celular de la flor de jamaica	53
3.4 ENZIMAS	59
3.4.1 Factores que influyen en la velocidad de las reacciones enzimáticas	60
3.4.2 Clasificación de enzimas y acción	61
3.4.2.1 <i>Celulasas</i>	63
3.4.2.2 <i>Hemicelulasas</i>	64
3.4.2.3 <i>Peroxidasas</i>	65
3.4.2.4 <i>Pectinasas</i>	66
<b>Capítulo 4: Propuesta del uso de las enzimas en la hoja de jamaica</b>	<b>67</b>
4.1 Propuestas	68
4.2 Condición de la extracción asistida por enzimas	70
4.3 Ventajas y desventajas de la propuesta	72
<b>Conclusiones</b>	<b>73</b>

<b>Bibliografía</b> .....	<b>74</b>
Anexo .....	85
Contenido de Figuras .....	85
Contenido de Tablas .....	86

## **Extracción de Antocianinas vía Enzimática**

### **Resumen**

Las antocianinas son pigmentos de origen natural, responsables de la coloración roja, morada y azul de algunas flores y frutas. Son sintetizadas mediante el metabolismo secundario de las plantas y se acumulan en el tejido dérmico del cuerpo de la planta, brindando protección de la radiación ultravioleta. Se usan en la industria alimentaria y farmacéutica como colorante natural teniendo principal aplicación en productos ácidos como bebidas, helados y productos de confitería.

Están categorizadas dentro de los alimentos funcionales, debido a su capacidad antioxidante, el cual brinda ciertos beneficios a la salud. Su coloración varía debido a su naturaleza química y pH. Las antocianinas tienden a cambiar su coloración según el pH, a pH ácido la coloración tiende a rojo y a pH básico tiende a ser azul. Los métodos convencionales que se usan para la extracción del pigmento implican la molienda y maceración con el uso de disolventes. Cuando la planta es sometida a molienda, el tamaño de partícula disminuye incrementando el área de contacto, esto permite una mejor interacción entre el disolvente y la matriz. Actualmente se busca incrementar la eficiencia del proceso de extracción con el menor consumo de energía y menor producción de contaminantes. El objetivo de este trabajo de revisión es proponer el uso de enzimas como un pretratamiento que permita el rompimiento celular para la extracción de antocianinas de la flor de jamaica. La flor de jamaica es un recurso natural poco aprovechado y rico en este tipo de compuestos. Esta propuesta permitiría aumentar el rendimiento de extracción entre un 60-80%. Además, las condiciones bajo las cuales se realizaría el pretratamiento favorecerían condiciones de química verde.

## Introducción

Durante los últimos semestres de la carrera de Química de Alimentos, realicé mi servicio social en el año 2018, en colaboración con el Doctor Arturo Navarro<sup>1</sup>. Quién ofrecía un programa de procesos químicos-biotecnológicos para conocer y obtener compuestos bioactivos de los alimentos originarios de México, en la Facultad de Química. En el programa tuve la oportunidad de conocer y analizar compuestos bioactivos, en este caso, las antocianinas. Asimismo, aprendí a evaluar diferentes métodos para su extracción y desarrollar procesos de secado para su uso en diferentes industrias. Los métodos de extracción se mencionan más adelante en el estudio.

A lo largo del programa, extraje antocianinas del maíz morado, jaborcaba, trueno de Tepeji Lupinos mexicano etcétera, empleando el método de ultrasonido. El proyecto, se basaba en la tesis “Aplicación de tecnologías emergentes para extracción óptima de antocianinas del totemoxtle y olote de maíz criollo morado”. La tesis fue escrita por María Fernanda Fernández, una estudiante de la Facultad de Química que cursaba su doctorado con un proyecto relacionado con las antocianinas. Durante mi estadía en el proyecto, ella me apoyaba con su experiencia para realizar los métodos de la mejor forma, también facilitaba muestras analizadas previamente de antocianinas.

En el proyecto, el método de extracción que se utilizó fue ultrasonido con las condiciones óptimas evaluadas por Fernández A. en el 2012. Antes de iniciar se ejecutaron varias pruebas con diferentes condiciones como, la polaridad de la disolución, tipo de ácido y concentración. Estas pruebas, se realizaron con el objetivo de darle reproducibilidad al método a nivel laboratorio. El siguiente objetivo era cuantificar antocianinas de las diferentes fuentes vegetales originarias de México.

---

<sup>1</sup> Profesor de Carrera “Titular” en el departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM.

Posteriormente, cada que se obtenían las antocianinas en polvo, eran sometidas a una evaluación. La importancia de la evaluación es asegurar la presencia de la molécula y se realizó mediante una cromatografía en capa fina<sup>2</sup>. Para asegurar la presencia de la molécula, se usó como referencia la cianidina-3-glucósido, extraída de la fresa por María Fernanda. Para la identificación de antocianinas, algunos autores (Tanya L, *et al.*, 2017; He, *et al.*, 2016; Fernández, 2012), utilizan la técnica de HPLC<sup>3</sup>, debido a que arroja análisis cualitativos y cuantitativos. Por otro lado, autores como Rasha K, *et al.* (2016) complementan en su evaluación de la molécula, cuantificando la actividad antioxidante.

Al término de mi participación en el proyecto, continúe con el proceso de secado para su uso en diferentes industrias, como proyecto de estancia estudiantil en el año 2019. Este nuevo proyecto, era en colaboración con la Doctora Angélica Román<sup>4</sup>, en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. La doctora, ofrecía un proyecto sobre micro encapsulación por secado por aspersion de antocianinas aciladas y no aciladas. El objetivo del proyecto abarcaba el estudio y selección de polisacáridos derivados de mucilago de chíá, nopal y xilanos de olote como encapsulante. El micro encapsulado es una técnica que en este caso, se usa para proteger a la antocianina de ser degradada<sup>5</sup> y proveerle estabilidad. Las pruebas realizadas involucraron factores diferentes, relacionados con el secador por aspersion como: la cantidad de sólidos, flujo y temperatura de entrada y salida. Sin embargo, para aprovechar al máximo mi fuente de antocianinas, fue necesario realizar la extracción más de una vez. En cada una de las extracciones realizadas, disminuía gradualmente la cantidad de antocianinas que sería un factor importante con gran impacto a nivel industrial.

---

<sup>2</sup> Es una técnica de cromatografía en donde se utiliza una placa inmersa en una fase móvil.

<sup>3</sup> Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés).

<sup>4</sup> Profesora de Carrera "Titular" en el departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa.

<sup>5</sup> Capítulo 2. Colorantes, Antocianinas.



Al cabo de estas experiencias y con el apoyo de la Doctora Carmina Montiel<sup>6</sup>, durante el Diplomado de Aditivos alimentarios impartido en el 2020. Desarrollé la hipótesis de que es factible, realizar un pretratamiento enzimático para la extracción de antocianinas a nivel industrial. Teniendo como ventaja una extracción con un método natural y con mayor rendimiento.

En esta investigación, propongo eficientizar la extracción de antocianinas a nivel industrial. Las antocianinas son una alternativa natural para sustituir el uso de colorantes sintéticos en los alimentos.

Las antocianinas son pigmentos de origen natural, responsables de la coloración roja, morada y azul de algunas flores y frutas. Son sintetizadas mediante el metabolismo secundario de las plantas y se acumulan en el tejido dérmico del cuerpo de la planta, brindando protección de la radiación ultravioleta. Como caso típico tenemos a la flor de jamaica, se conoce por diferentes nombres tales como flor de dardo, té rojo, rosa de jamaica entre otros. Es nombrada científicamente como *Hibiscus sabdariffa L.* Se cultiva principalmente por sus hojas, cálices carnosos, semillas y fibras, teniendo un interés comercial en la deshidratación de los cálices. Los cálices deshidratados se utilizan principalmente para la preparación de bebidas frescas e infusiones, una vez preparada la bebida, la flor es desechada. Esto nos lleva al segundo propósito de estudio, elevar la competitividad de la flor de jamaica en el mercado nacional e incluso internacional.

Las antocianinas están categorizadas dentro de los alimentos funcionales debido a su capacidad antioxidantes; el cual brinda ciertos beneficios a la salud. Los antioxidantes naturales son preciados por ser fuertes secuestradores de los radicales libres<sup>7</sup>. Nuestro organismo durante la respiración y metabolismo celular genera los radicales libres, responsables de muchas enfermedades degenerativas, enfermedades cardiovasculares, cataratas, arterioesclerosis, muerte celular, envejecimiento precoz y cáncer. Al colisionar con el radical libre, el antioxidante cede un electrón, oxidándose a su vez y es transformado en un radical libre no

---

6 Profesora de carrera "Titular" en el departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM.

7 Los radicales libres son especies químicas con uno o dos electrones no apareados en su orbital más externo, que se pueden crear de múltiples maneras: exógena (por ejemplo, la radiación ultravioleta) o endógena (Andzi & Feuya, 2016).

tóxico. Por esta razón, autores como Cid- Ortega, *et al.*, 2012; López-Nahuatt G. *et al.*, 2017 y Sáyago Ayerdi, S. G. *et al.*, 2007 dicen que los antioxidantes tienen la capacidad de ayudar a contrarrestar cierto tipo de enfermedades.

Las antocianinas pueden presentar variedad en su coloración, esto se debe a su naturaleza química y el pH en que se encuentra. El pH también afecta la estabilidad química, decolorando la molécula en valores de pH entre 4,0 y 5,0. En soluciones ácidas, la antocianina es roja. Con el aumento del pH adquiere colores intensos en la gama de los azules, verde y amarillos. En solución alcalina, la antocianina presenta una coloración morada.

Ciertamente, las antocianinas son moléculas inestables y rápidamente perecibles, su estabilidad es afectada por varios factores como: la temperatura de almacenamiento, concentración, luz, oxígeno, solventes y metales. Asimismo, los métodos convencionales que permiten la extracción del pigmento, implican la molienda y maceración con el uso de solventes ácidos. Seguido de un lavado que permite retirar moléculas indeseables, finalizando con un secado con el que se obtienen las antocianinas en polvo. Para obtener una extracción exitosa se debe considerar cada factor que pueda afectar su estabilidad, desde el método de molienda hasta el método de secado.

El documento está integrado por 4 capítulos, cuyo contenido se describe a continuación.

El capítulo 1, clasifica a las antocianinas como colorantes naturales con aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica. Describe su estabilidad química y el cómo esa estabilidad afecta la coloración. Así mismo, explica cómo son sintetizadas y su producción anual.

El capítulo 2, detalla los métodos de extracción existentes para antocianinas. Así como los métodos para su identificación y cuantificación. Por último en el capítulo se explica la capacidad antioxidante, el valor como alimento funcional y mecanismo de acción en el cuerpo.

El capítulo 3, presenta una revisión bibliográfica de la flor de jamaica, debido a que es una fuente potencial para la extracción de antocianinas. Enumera las propiedades fisicoquímicas y la composición proximal de la flor de jamaica y en qué parte de su anatomía vegetal se localizan las antocianinas. Así mismo se explica la importancia de la composición química de la pared celular y la protección que esta ejerce sobre las antocianinas. Por último detalla que es una enzima y relaciona la información del capítulo 1,2 y 3, resaltando los factores importantes que deben ser considerados para la extracción.

El capítulo 4, expone la propuesta del uso de enzimas para la extracción de antocianinas en la flor de jamaica. La propuesta incluye un diagrama de proceso, con equipos y condiciones a seguir, fundamentados en estudios relacionados con extracción de aceites y antocianinas en diferentes fuentes.

Finalizando con las conclusiones a las que se llega, después de la revisión bibliográfica e incluye las perspectivas.

## **Capítulo 1**

### **Los colorantes: antecedentes, clasificación y diferenciación**

#### **1.1. Antecedentes Históricos**

De acuerdo con la definición para los fines del CODEX Alimentarius, “los aditivos alimentarios son cualquier sustancia que por sí misma no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición al alimento en sus fases de producción, fabricación, elaboración, preparación, tratamientos, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento resulte directa o indirecta por sí o sus subproductos, un componente del alimento o bien afecte a sus características” (1981). En pocas palabras se entiende como sustancias que se incorporan en un alimento –intencionalmente- con el objetivo de modificar sus características organolépticas.

Existen varios grupos de aditivos en la industria alimentaria, los cuales tienden a ser clasificados de diversas maneras. Por ejemplo: Fuente de origen, acción o funcionalidad en el alimento, estructura y configuración química, efecto en la aplicación inocuidad y estatus legal. De acuerdo a la clasificación de funcionalidad se tienen los siguientes aditivos: acidulantes, antiespumantes, conservadores, emulsificantes, edulcorantes, espesantes y colorantes, entre otros.

Los colorantes son aditivos que confieren o modifican el color de los alimentos con la finalidad de hacerlos más atractivos para el consumidor. El color es una cualidad fundamental en la elección de un alimento, es considerado un factor psicológico de aceptación. Este puede influir en la percepción del sabor, olor, frescura, contenido de nutrientes y calidad del producto. En ocasiones un

alimento pierde su coloración a causa de los tratamientos tecnológicos aplicados durante el proceso de producción, la estación del año o condiciones de almacenamiento. Factores como la luz, el aire, la temperatura y los compuestos capaces de interactuar con el alimento pueden degradar el color. Así que, para hacerlos atractivos a los consumidores, deben colorearse artificialmente (Ibáñez F., 2003). Sin embargo, no es correcto pensar que la adición de estos compuestos es una práctica moderna, de hecho, los primeros aditivos que se utilizaron fueron los conservadores y los colorantes.

Al igual que con los aditivos, la clasificación de los colorantes se puede realizar de diversas maneras: según el origen, la función, la estructura química, etc. La industria alimentaria diferencia dos tipos de colorantes según su origen: naturales o sintéticos. Pero tanto la industria como los consumidores han demostrado un creciente interés por los colorantes naturales en línea al reemplazamiento de los colorantes sintéticos. Además, los avances científicos van en esta misma dirección, dando claras evidencias de que los colorantes naturales promocionan la calidad de vida y mejora de la salud, mientras que los sintéticos están evaluados críticamente (Martins, N., *et al.*, 2016).

En virtud de la opinión de Natalia, *et al.* (2016), hacia la industria alimentaria y la evolución del uso de colorantes, es común encontrarse con algunas opiniones y, a veces, dudas sobre los productos que la industria alimentaria oferta. Por todo ello, la legislación se ha ido volviendo más restrictiva en la aprobación de unos colorantes u otros, ya que cada vez está más regulada, acorde a las exigencias de la población.

Las empresas relacionadas a la elaboración de alimentos, deben adaptarse de forma adecuada a la legislación correspondiente. Esta depende de dos factores principales: el país de origen y del lugar al que vayan a exportar sus productos. Actualmente hay 6 legislaciones vigentes sobre aditivos: Food Drug & Cosmetic Act (G.R.A.S & Delaney), Code of Federal Regulations (CFR Title 21), Codex Alimentarius (F.A.O. & W.H.O. & JECFA), Chemical Abstracts Service (C.A.S.), Food Chemical Codex (N.A.S.) y la Secretaria de Salud (Ley General de Salud-Acuerdo de Aditivos Alimentarios) COFEPRIS.

## 1.2. Colorantes Sintéticos

Los colorantes sintéticos son los que no se encuentran en la naturaleza y se generan por síntesis química. Se utilizan desde antes del siglo XIX, originalmente se utilizaban pigmentos de extractos vegetales y posteriormente se comenzaron a usar pigmentos minerales, pero estos eran tóxicos. Fue entonces cuando el coloreado artificial de los alimentos ganó importancia en la industria.

La mayoría de los colorantes sintéticos son solubles en agua, por lo que su uso y producción, es más económica, fácil y rápida que los colorantes de origen natural; se les puede encontrar en forma de sales sódicas, líquidos y materiales pastosos, al igual que en forma de lacas insolubles para productos sólidos, evitando que se destiñan, como pueden ser algunos dulces confitados (Farbe-Naturals, 2021).

Los tipos de colorantes sintéticos se diferencian por su forma de obtención, el color que dan a los productos, los tipos de alimentos en los que pueden usarse y otros factores, como si es transparente (bebida) u opaco. Los principales tipos de colorantes que hay en el mercado y han sido aprobados para el consumo humano son los colorantes azoicos, los cuales deben sus color a la presencia de un grupo azoico; los colorantes azoicos autorizados para su utilización como aditivos alimentarios son todos solubles en agua, puesto que los colorantes pertenecientes a este grupo que son solubles en grasa no están aprobados para el consumo y tienen otros usos. Entre los principales se encuentran: la tartrazina (E-102), amarillo anaranjado s (E-110), azorrubina, carmiosina (E122), rojo Ponceau 4R (E-124), Negro brillante (E-151), Marrón FK (E-154), Litol Rubina BK (E-180, entre otros (Farbe-Naturals, 2021).

Otros tipos de colorantes que se utilizan en los alimentos como los derivados del trifenilmetano son muy utilizados en los productos elaborados en Estados Unidos, pero están prohibidos en la Unión Europea, por lo que muchos de los alimentos que los contienen no pueden ser comercializados a esos países. El azul brillante (azul No. 1) y el verde rápido (verde No. 3) tienen una estructura muy semejante y se utilizan en el coloreado de vegetales tratados térmicamente, para compensar la degradación de la clorofila (Farbe-Naturals, 2021).

Existen miles de colorantes que no están autorizados para el consumo humano, pero se producen para ser utilizados en otros artículos, incluyendo textiles. A pesar de que no se ha demostrado que los colorantes sintéticos autorizados tengan efectos sobre la salud, la mayoría de las empresas de la industria alimentaria y de bebidas han optado por el uso de colorantes naturales, aunque suelen ser más costosos y difíciles de obtener colores tan específicos (Farbe-Naturals, 2021).

### **1.3. Colorantes Naturales**

Los colorantes naturales son aquellos obtenidos de productos naturales o de síntesis que tienen su homólogo en la naturaleza. El término “natural”, al contrario que los anteriores, tiene un juicio favorable en el campo de alimentación. Esto se debe a que los conocidos en la industria como “naturales”, de fuentes vegetales, minerales y semillas se encuentran dentro de los colores exentos de certificación.

Los colorantes considerados en esta clasificación presentan diferencias en su naturaleza. Para ilustrar mejor, existen ingredientes o alimentos con características propias que pueden aportar color que son obtenidos por métodos físicos y agua. Sin embargo, no son declarados como aditivos y se les conoce como alimento que colorea. Los productos obtenidos por extracción con solventes a partir de tejidos vegetales, animales o minerales, son considerados como color natural. En cambio, cuando hablamos de un producto que existe en la naturaleza,

pero es sintetizado químicamente, el componente es conocido como idéntico al natural.

Para considerar un color certificado, este debe poseer estructura conocida, cada lote debe estar aprobado por la Admisión de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), y poseer especificaciones con alta pureza. Sirvan de ejemplo, los colorantes naturales autorizados existentes como son, los carotenos (E 160a) los cuales presentan una coloración naranja, los antocianos (E163) azul-violeta, las betalaínas (E 162) que presentan una tonalidad morada y las clorofilas (E 140) que aportan un color verde (Escudero-Gilete., *et al.*, (2017).

El óxido e hidróxido de hierro (E 172) que presenta una coloración amarilla es de origen mineral, y el ácido carmínico (E1220) procedente de la cochinilla presenta una tonalidad roja. (Escudero-Gilete., *et al.*, (2017).

### **1.3.1 ANTOCIANINAS**

Entre los colorantes naturales se encuentran las antocianinas que son responsables de la coloración roja, morada y azul de algunas flores y frutas (Figura 1). Pertenecen a un grupo de pigmentos hidrosolubles que constituyen una de las subclases de los flavonoides. Estos a su vez son un grupo de compuestos antioxidantes cuya capacidad es debida a los grupos hidroxilo unidos al anillo de su estructura (Figura 2). Las antocianinas pueden actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, desactivadores de oxígeno singlete, captadores de radicales superóxido e incluso como quelantes de metales (Procházková *et al.*, 2011).





Figura 1. Antocianinas en el reino vegetal.

Las antocianinas no se consideran como nutrientes, sin embargo, poseen actividad biológica<sup>8</sup>, son sintetizadas mediante el metabolismo secundario de las plantas. Se acumulan en el tejido dérmico del cuerpo de la planta, debido a su papel en la protección contra los rayos UV, y como productos químicos de defensa contra los patógenos (Babbar *et al.*, 2015).

Las antocianinas son moléculas inestables y rápidamente perecibles, su estabilidad es afectada por varios factores como: la temperatura de almacenamiento, concentración, luz, oxígeno, solventes y metales, flavonoides, proteínas e incluso, iones metálicos (Castañeda *et al.*, 2009). Se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal (Figura 1) como, por ejemplo: la flor de jamaica, zanahoria morada, col morada, maíz morado, frutos rojos, betabel, uva negra, granada, entre otros.

Químicamente, las antocianinas son glucósidos<sup>9</sup> de las antocianidinas o también conocidas como agliconas, su estructura básica consiste en el ión flavilo (Figura 2 (1)). Normalmente, el ion funciona como catión y consta de dos grupos

---

<sup>8</sup> Mecanismo antioxidante en el cuerpo.

<sup>9</sup> Molécula en la cual un glucósido se enlaza a través de su carbono anomérico a otro compuesto de diferente naturaleza química, mediante un enlace O-glucosídico.

aromáticos: un benzopirilio (Figura 2 (1a)) y un anillo fenólico (Figura 2 (1b)) unido mediante un enlace carbono-carbono. (Badui, 2006). Cuando las antocianidinas (Figura 2(2)) se encuentran en su forma glicosilada, dicho de otra forma, unido a un azúcar por medio de un enlace  $\beta$ -glucósido, se conocen como antocianinas (Figura 2 (3)) (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

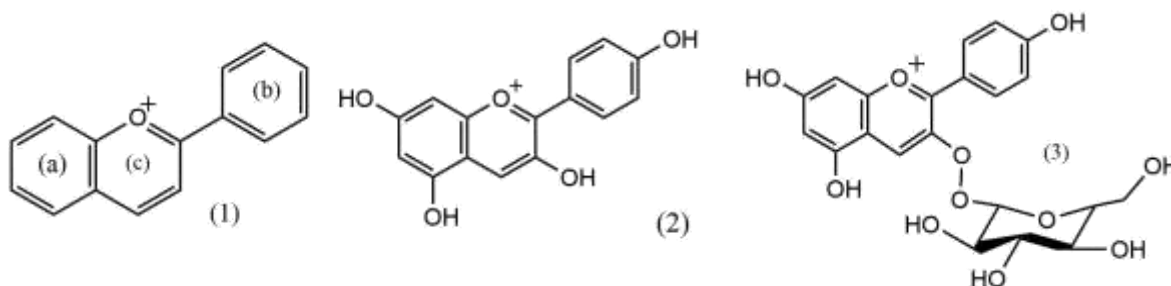


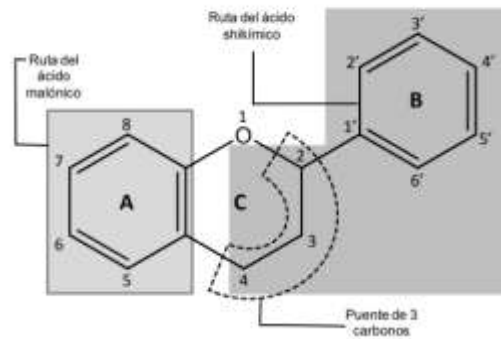
Figura 2. (1) Cati3n Flavilio; (2) Pelargonidina (antocianidina); (3) Pelargonidina-3-O-gluc3sido (antocianina).

De acuerdo con avalos (2009), el anillo A de las antocianinas se sintetiza por la ruta del ácido mal3nico con la condensaci3n de tres mol3culas de malonil-CoA. En cambio, el anillo B se sintetiza por la ruta del ácido shik3mico (Figura 3 y 4). La ruta del ácido shik3mico, es responsable de la bios3ntesis de la mayor3a de los compuestos fen3licos de plantas. A partir de eritrosa-4-fosfato y del ácido fosfoenolpir3vico, se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la s3ntesis de ácido shik3mico, derivados de éste y aminoácidos aromáticos<sup>10</sup> (fenilalanina, tript3fano y tirosina). La fenilalanina y el tript3fano se encuentran entre los aminoácidos esenciales para los animales que se incorporan en la dieta. La tirosina no es esencial en el sentido de que los animales pueden sintetizarla por hidroxilaci3n de la fenilalanina (avalos-Garc3a., *et al.*, 2009).

El cido shik3mico da paso a la fenilalanina que por acci3n de una fenilalanina amon3 liasa (PAL) y despu3s de una p3rdida de amon3aco (NH<sub>3</sub>), se convierte en ácido p-coumárico.

<sup>10</sup> Los aminoácidos que tienen un anillo aromático (fenilalanina, tript3fano y tirosina) se denominan aminoácidos aromáticos. Se usan para producir hormonas y varias aminas en el cuerpo.

El p-coumaril-CoA luego participa en una reacción de condensación con las tres moléculas de malonil- CoA para formar una chalcona de 15 C, reacción catalizada por una chalcona sintetasa. Este compuesto intermedio de 15 C es transformado en una flavanona en una reacción catalizada por una chalcona isomerasa. En seguida, la flavanona es transformada en la correspondiente antocianidina por una reacción de hidroxilación en el carbono 3 seguida por una deshidratación (Figura 5) (Zhang, *et al.*, 2014).



**Figura 3 Estructura general de los flavonoides proveniente de los productos de la ruta del ácido shikímico y el ácido malónico. La numeración es de acuerdo a la posición de los sustituyentes de cada flavonoide.**

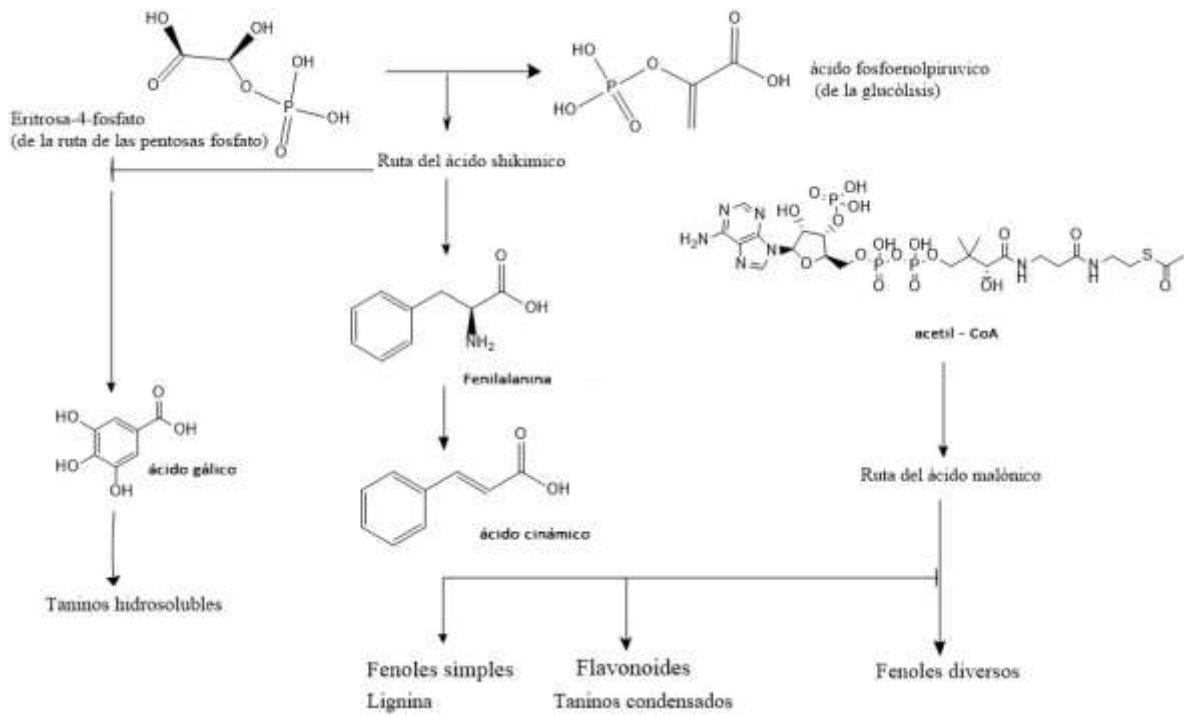


Figura 4. Rutas de síntesis de compuestos fenólicos (modificado de Ávalos-García, *et al.*, 2009).

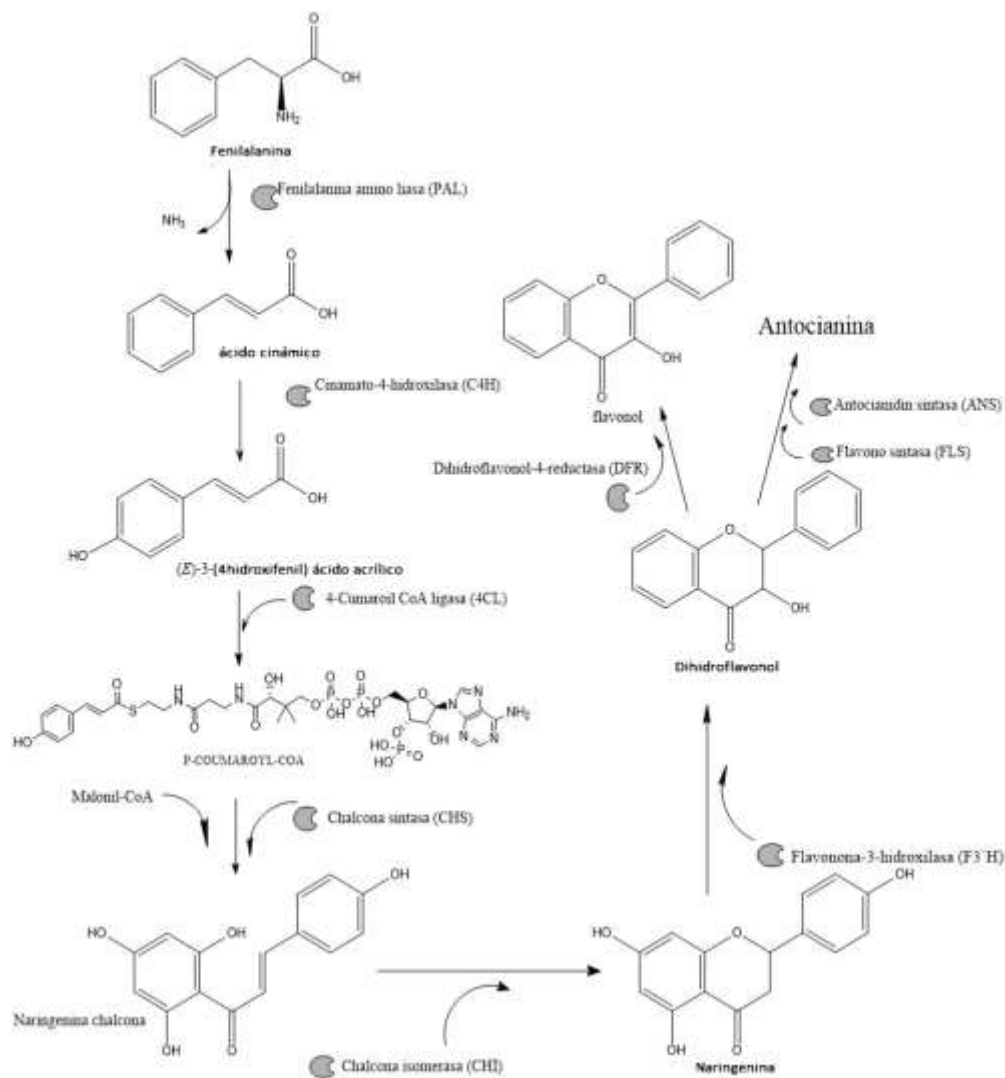


Figura 5 Ruta general de biosíntesis de las antocianinas. (Modificado de Ávalos-García, et al., 2009).

Tabla 1: Las enzimas participantes en la ruta del ácido shikímico (Zhang et al., 2014).

PAL	Fenilalanina amino liasa	Cataliza la conversión de la L-fenilalanina a ácido trans-cinámico y amoniaco.
C4H	cinamato 4-hidroxiilasa	Cataliza la síntesis (hidroxilación) del Ácido p-cumánico. A partir del ácido p-cumánico y la 4-coumarato.
4CL	4-cumaroil coA ligasa	Cataliza la formación de ATP dependiente del CoA tioester 4-coumaril CoA (p-coumaroil CoA)
CHS	chalcona sintasa	Cataliza la adición de tres moléculas mediante reacciones secuenciales de descarboxilación y condensación.

CHI	chalcona isomerasa		Cataliza el proceso de isomeración del intermediario naringenina. (La naringenina chalcona a una flavona).
F3'H	flavanona hidroxilasa	3-	Cataliza la conversión de flavonas como la apigenina o la luteolina (dihidroflavonol).
DFR	dihidroflavonol reductasa	4-	Cataliza la oxidación de un compuesto con la reducción de otro. Cataliza la producción de flavan-3,4-dioles (leucoantocianidinas) mediante la reducción de tres dihidroflavonoles incoloros: dihidrokaempferol (DHK), dihidroquercetina (DHQ); y dihidromiricetina (DHM).
ANS	antocianidin sintasa		Hidroxila el carbono 3 de las leucoantocianidinas para producir las antocianidinas.
FLS	flavonol sintasa		Cataliza la síntesis de los flavonoides, usando NADPH como cofactor.

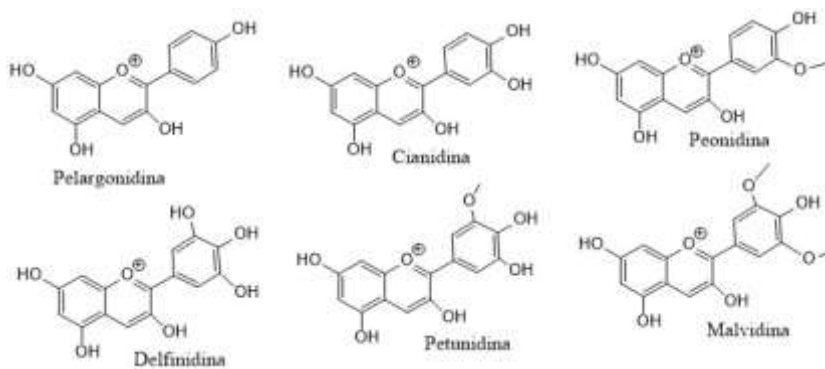
Por último, la molécula de antocianidina se estabiliza por glucosilación del heterociclo. Reacción en la que interviene una glicosil transferasa<sup>11</sup> y posterior posibles reacciones de metilación<sup>12</sup> de los hidroxilos seguidas de acilaciones<sup>13</sup> (Zhang *et al.*, 2014).

En la literatura se describen diferentes antocianidinas en plantas como son: pelargonidina, cianidina, delfidina, peonidina, petunidina y malvidina. (Figura 6). Las tres primeras son más frecuentes en frutos, en tanto que el resto lo son en flores. En las plantas las antocianidinas no se acumulan como tal, sino en su forma glucosilada (Figura 7b). El azúcar presente en la molécula les confiere una gran solubilidad y estabilidad, generalmente se une a la antocianidina en la posición 3 del grupo fenólico pero, puede también hacerlo en la posición 5 y 7. Con base en el número de azúcares presentes en su estructura, las antocianinas se clasifican en: monoglucósidos (un azúcar), diglucósidos (dos azúcares) y triglucósidos (tres azúcares). Los tipos de azúcares presentes pueden ser: monosacáridos, disacáridos o trisacáridos (Aguilera-Ortiz *et al.*, 2011).

11 Una transferasa, es una enzima que cataliza la transferencia de un grupo funcional, por ejemplo: un metilo o un grupo fosfato, de una molécula donadora a otra aceptora.

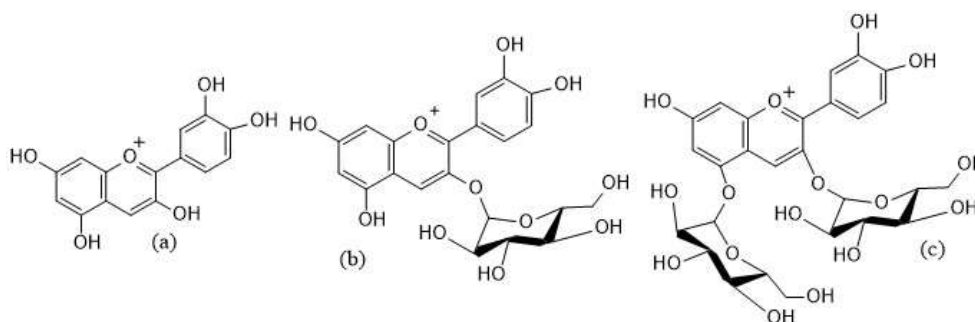
12 Reacción química por la cual se agrega un grupo metilo a otras moléculas.

13 Reacción química por la cual se agrega un grupo acilo a un compuesto.

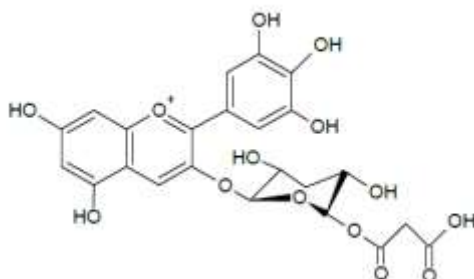


**Figura 6 Estructura molecular de algunas antocianidinas comunes.**

Los monosacáridos más comunes son: pentosas como arabinosas y xilosas, o bien hexosas, de las cuales la D-glucosa es la más frecuente, aunque también pueden estar presentes galactosa o ramnosa. Los disacáridos más frecuentes son genobiosa, soforosa, sambubiosa y rutinosa. Los trisacáridos pueden ser lineales como la gentotriosa (Figura 7) (Aguilera-Ortíz, *et al.*, 2011).



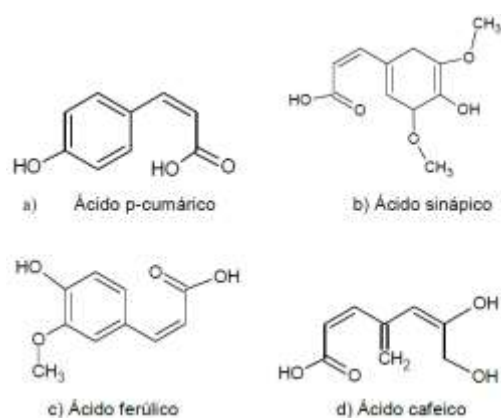
**Figura 7 (a) Cianidina; (b) Crisantemina (cianidina-3-O-glucósido); (c) cianidina-3,5-O-diglucósido.**



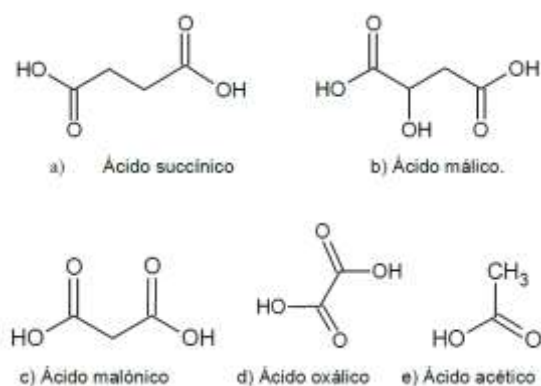
**Figura 8 Estructura de la delfinidina-3-malonilglucosido.**

En algunos casos, los azúcares de las antocianinas están acilados con grupos derivados del ácido acético. De igual forma con algunos de los cuatro ácidos cinámicos a través de enlaces con el oxígeno, un ejemplo, la delfidina-3-malonilglucosido. (Figura 8). Los agentes acilantes más frecuentes son los ácidos cafeicos, ferúlico, sinápico, los ácidos p-cumaricos (Figura 9) y ácidos alifáticos como el acético, málico, malónico, oxálico, succínico y tartárico (Figura 10).

Se ha observado, que la adición de un grupo ácido (acilo) al residuo de azúcar de la molécula de antocianidina, le confiere estabilidad ante condiciones extremas de pH y temperatura. Cuando en la molécula de antocianina se encuentran únicamente azúcares, se denominan no aciladas. Por el contrario, los azúcares están presentes uno o varios radicales acilos, se catalogan como aciladas (Salinas, *et al.*, 2010).



**Figura 9 Ácidos cinámicos comúnmente acilados con los residuos de azúcar de las antocianinas.**



**Figura 10 . Ácidos alifáticos comúnmente acilados con los residuos de azúcar de las antocianinas.**



Chávez (2014) destaca que esta modificación es particularmente importante porque juega un rol significativo en la formación de las estructuras estabilizantes del pigmento. Más del 60% de las antocianinas reportadas tienen uno o más residuos acilados, y los colorantes y funciones de estos pigmentos en las plantas están altamente afectados por la naturaleza, el número, y la posición del enlace del grupo acilo.

Las antocianinas existen en 4 estados dependiendo del pH: cationes flavilio, hemiacetales, bases quinoidales y chalconas a pH de 1 - 3, 3 - 5, 6 - 8 y 7 - 8, respectivamente (Brouillard, 1982). A pH <4 adopta una estructura de tipo oxonio (catión Flavilio), siendo esta su forma más estable y se torna de color rojo intenso. Esto, gracias a la conjugación extendida entre los dos fragmentos aromáticos, los cuales permiten la absorción de luz visible con una longitud de onda variable (480 - 550  $\text{cm}^{-1}$ ). A valores de pH más altos, entre 4 y 5, la molécula experimenta un ataque nucleofílico sobre el C2 por parte de una molécula de agua. Adopta una configuración de tipo carbinol pseudobase, siendo esta su forma menos estable, en vista de ser carente de color. Debido a la ausencia de conjugación entre el fragmento monocíclico y el resto de la molécula, lo que impide la absorción de luz visible.

Por encima de pH 5 vuelven a adquirir colores intensos en la gama de los azules, verdes y amarillos. A causa del predominio de conformaciones neutras o aniónicas con una fuerte conjugación. Y a valores de pH superiores a 7 se presentan las formas quinoidales de color púrpura oxidándose con el aire (Figura 11) (Castañeda, 2014).

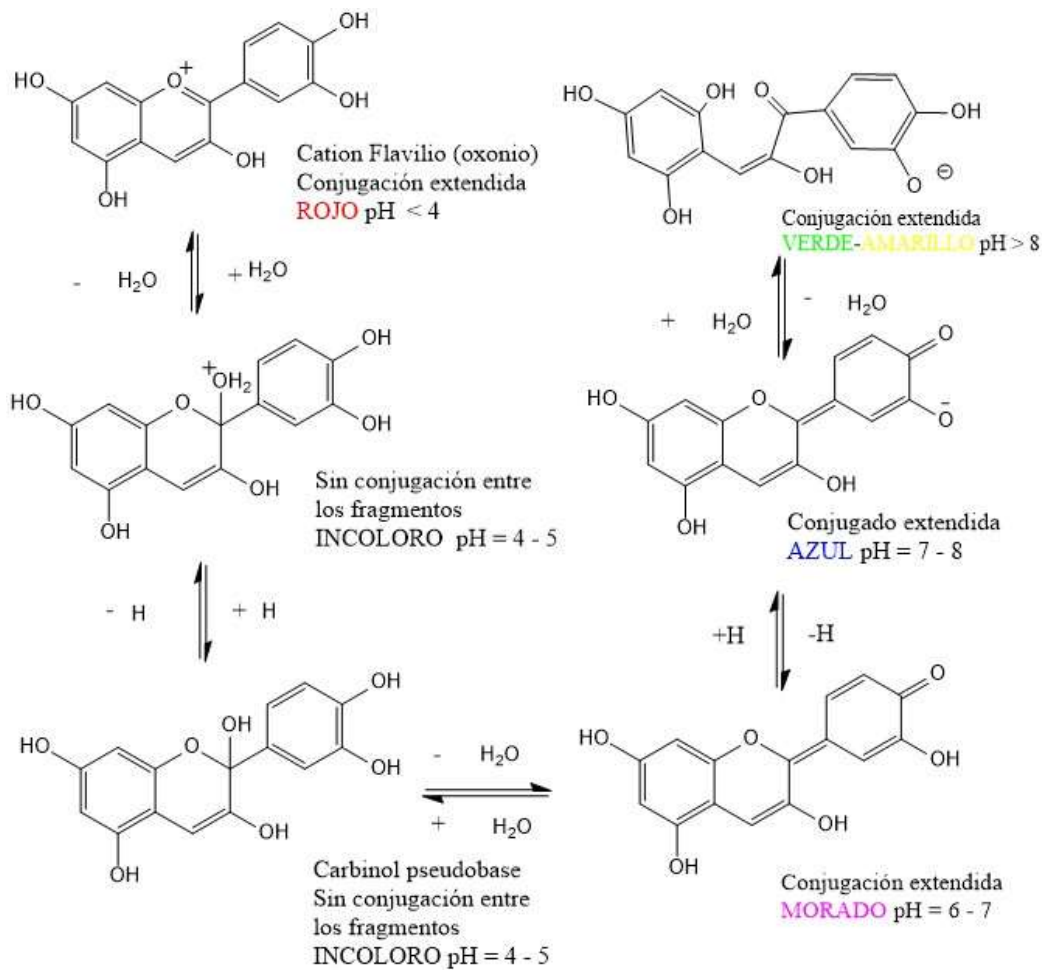


Figura 11 Transformaciones moleculares en función del pH para la Cianidina.

### 1.3.2 PRODUCCIÓN ANUAL DE ANTOCIANINAS

De acuerdo con Mordor-Intelligence (2021), el mercado mundial de antocianinas está creciendo a una tasa compuesta anual del 4.5 % durante el periodo de pronóstico (2020-2025). El mercado se ha segmentado en tres sectores: El primero, por tipo de antocianina, como: cianidina, malvidina, delfidina, peonidina, entre otras. El segundo, por aplicación, el cual incluye: productos farmacéuticos, productos para el cuidado personal, piensos para animales y el sector de alimentos y bebidas. Estos, se bifurcan en, productos lácteos, bebidas,

panadería y confitería. Y el tercero, por geografía, que incluye: América del Norte, Europa, Asia-Pacífico, América del Sur, Medio Oriente y África (Figura 12).



**Figura 12 Mapa del tamaño del mercado de las antocianinas por región mundial en el 2018.**

En un frente de segmentación por aplicación, las industrias de alimentos y bebidas representan la mayor parte del mercado. Debido al colorante natural con una gran cantidad de beneficios para la salud y se observa que el sector del cuidado personal tiene una tendencia de crecimiento en el mercado. Geográficamente, Europa domina las cuentas con la mayor participación. La región de Asia-Pacífico enfrenta el mercado de más rápido crecimiento, debido a la creciente demanda de colorantes naturales para el sector de alimentos y bebidas y productos para el cuidado personal. Sin embargo, al ser una alternativa prometedora a los colorantes alimentarios sintéticos, dado que las antocianinas, si son consumidas en exceso no crean riesgos para la salud, no producen efectos secundarios ni toxicidad. El sector de los colorantes alimentarios sintéticos sigue representando una buena participación en el mercado, ofreciendo el menor costo y alta estabilidad. A comparación con colores naturales como antocianinas, clorofila, carotenoides y cúrcuma, siendo así el principal factor de contención del mercado. (Mordor-Intelligence, 2021).

La mayor demanda en el mercado de antocianinas, está en productos para el cuidado personal como: lápiz labial, loción corporal y crema facial. En los últimos años ha aumentado, debido a su alto nivel de actividad antioxidante y una amplia

gama de beneficios para la salud. Estos van desde la prevención de enfermedades crónicas hasta la mejora del aspecto de la piel. Por lo tanto, muchos jugadores clave están infundiendo antocianina como ingrediente clave en sus productos para el cuidado de la piel y el cuerpo para seguir la tendencia. Por ejemplo, Tatcha LLC ofrece un producto para el cuidado de la piel "The Dewy Skin Cream", rico en antocianinas (Mordor-Intelligence, 2021).

Este mercado es altamente competitivo, hace énfasis en la fusión, expansión, adquisición y asociación de las empresas junto con el desarrollo de nuevos productos. Con enfoques estratégicos adoptados por las empresas líderes para impulsar la presencia de su marca entre los consumidores. Por ejemplo, MEDOX®, un producto de extracto de bayas de Evonik Nutrition & Care GmbH, ofrece un suplemento dietético con un contenido alto y estable de antocianinas. Además, en 2018, Sensient Technologies Corporation adquirió GlobeNatural, una empresa de alimentos e ingredientes naturales con sede en Perú. Esto con el objetivo de mejorar la cartera de productos y las capacidades de fabricación de la empresa. Chr. Hansen Holding A / S expandió su negocio de colores naturales en América del Norte, mediante la compra de una planta de fabricación en Wisconsin (Mordor-Intelligence, 2021).

Con base en la información sobre el análisis del crecimiento de las antocianinas a nivel mundial, sabemos que el sector alimenticio solo es un sector de los 4 posibles en el mercado. Se confirmó que al menos 3 de estos sectores tienen desarrollos de innovación con el objetivo de impulsar el uso de antocianinas. Como consecuencias de lo expuesto es decisiva la optimización en la metodología de extracción convencional a nivel industrial.

## Capítulo 2

### Métodos de extracción

Las antocianinas son moléculas polares y consecuentemente son más solubles en solventes polares que en no polares. Los disolventes más usados para su extracción son combinaciones acuosas de etanol, metanol o acetona. A valores de pH ( $\text{pH} \neq 4$ ) donde las moléculas de antocianinas no están ionizadas, pueden ser solubles en éter y no son estables en soluciones neutras y alcalinas. Por tanto, los métodos convencionales empleados para la extracción de antocianinas, implican el uso de disolventes orgánicos en mezclas acuosas previamente acidificadas (Delgado-Vargas, *et al.*, 2000).

Generalmente, las antocianinas son extraídas moliendo, secando o liofilizando las frutas, vegetales y hojas o solamente remojando las muestras frescas y subsecuentemente realizando la extracción con solventes. Estas metodologías implican la extracción de sustancias no fenólicas como los azúcares, ácidos orgánicos y proteínas, y se requiere una subsecuente purificación (Ignat 2011).

Hoy en día existen diferentes métodos de extracción en donde se busca incrementar la eficiencia del proceso de extracción, las tecnologías novedosas implican un menor consumo de energía, son menos contaminantes y permiten realizar procesos químicos más selectivos. Se han estudiado y probado la extracción asistida con ultrasonido, con microondas, con pulsos eléctricos, con fluidos supercríticos, con líquidos presurizados y recientemente con enzimas.

#### 2.1. Extracción con solventes

En relación a la extracción, el método usual es la extracción sólido-líquido. Se basa principalmente en la selección de solventes, temperatura y agitación con el fin de incrementar la solubilidad de los materiales y la tasa de transferencia de masa. Se separan los compuestos con base en sus solubilidades.

Existen dos métodos de extracción acuerdo a la temperatura, los cuales son: extracción en frío y extracción en caliente. La extracción en frío, consiste en sumergir el producto con la cantidad suficiente de disolvente para cubrirlo totalmente. Una vez sumergido el producto y obtenido el pigmento en el disolvente, este se absorbe en amberita, para realizar un enjuague en un solvente volátil y concentrar hasta obtener el pigmento. Presenta como ventaja utilizar equipos simples y cantidades mínimas de energía y no altera las propiedades de la molécula. El otro método es extracción en caliente, el cual es similar al método en frío, con la única diferencia del incremento de temperatura, la cual acelera el proceso. Sin embargo, la desventaja de provocar un incremento de temperatura, es la destrucción de algunas propiedades del compuesto de interés. En vista de que muchas veces se trata de compuestos termolábiles (Fernández A., 2012).

El carácter polar de la molécula de antocianina permite su solubilidad en varios solventes, tales como alcoholes, acetona y agua. Se debe tener cuidado en la extracción con disolventes acidificados porque las antocianinas aciladas pueden ser degradadas mediante una hidrólisis<sup>14</sup> y en el caso de antocianinas 3-monosido se puede romper el enlace glucosídico provocándole inestabilidad.

La tabla 2, contienen los resultados con mayor eficiencia en la extracción por solventes de antocianinas (Rasha, 2016), en donde muestran los mg de antocianinas sobre 100 g de flor de Jamaica. La extracción en agua, en este caso ( $572.54 \pm 9.39$  mg/100g), se usa como base para la comparación de la eficiencia de extracción. Uno de los objetivos de este método, es aumentar la solubilidad de las antocianinas con base en la polaridad del solvente. Cabe resaltar que el etanol es más polar que el agua. Podemos observar que al modificar la polaridad con etanol: agua 50:50, incrementa un 11.79% la extracción. Sin embargo, la reduce en un 15.13%, al incrementar la cantidad de etanol: agua en 80:20.

No se debe olvidar que, entre los factores que pueden afectar la estabilidad de la molécula se encuentra el pH. La forma más estable de la molécula es a valores de pH bajos. Así, Rasha reporta un incremento del 13.31% en rendimiento,

---

<sup>14</sup> En el proceso de hidrólisis un hidrógeno de la molécula de agua se enlaza al oxígeno del extremo de una molécula de azúcar, mientras que el hidroxilo se enlaza al extremo del resto (Alvares, 2021).

disminuyendo el pH en agua, haciendo uso de un ácido fuerte (HCl) al 1%. Del mismo modo, obtiene un incremento del 10.89%, haciendo uso de un ácido débil al 2% (CH<sub>3</sub>COOH), aunque es menor el incremento, este puede reducir la probabilidad de dañar la antocianina, si está acilada.

También se reporta un incremento del 26.79% en el rendimiento bajo condiciones que favorecen la solubilidad y estabilidad de la molécula. Sin duda alguna, es notable la influencia que se tiene en la extracción, al seleccionar una buena sinergia entre el solvente y pH, esta se ve reflejada al momento de cuantificar las antocianinas.

*Tabla 2 Contenido de antocianinas con diferentes concentraciones de solventes acidificados (modificado de Rasha K, et al., 2016).*

Condiciones de extracción de Antocianina	Antocianinas de la flor de jamaica <i>Hibiscus</i> (mg/100 g)
Agua (0% Etanol)	572.54 ± 9.38
50 % Etanol	640.03 ± 1.61
80 % Etanol	485.90 ± 4.80
Agua acidificada (1% HCl)	648.75 ± 13.00
50 % Etanol + 1% HCl	685.78 ± 1.93
Agua acidificada (2% ácido acético)	634.90 ± 4.25
2 % ácido láctico en 80 % Etanol	725.91 ± 4.14

## 2.2. Extracción asistida con microondas

En la extracción asistida por microondas, se ocasiona un calentamiento selectivo de la materia a utilizar (matriz), sobre el extractante. Las ondas dan como resultado un calentamiento localizado dentro del sólido, creando bolsas de alta temperatura y presión. Este aumento, ocasiona la migración selectiva de los compuestos fenólicos de la matriz al solvente.

La ventaja de usar este método es que el proceso se realiza a una mayor velocidad y con una recuperación similar a los métodos de extracción convencionales (Pare *et al.* 1997).

La radiación con microondas es un modo alternativo de introducir energía térmica. Dicho con las palabras de Correa (2011), la energía de microondas posee un bajo contenido energético en sus fotones (0.03 kcal/mol), la cual, al ser comparada con la energía de los enlaces químicos, que va de un intervalo de 20 a 80 kcal/mol se considera relativamente baja, en consecuencia, las microondas no podrían afectar directamente la estructura molecular. Dicho de otra forma, las microondas no contienen la energía suficiente para provocar cambios químicos en los compuestos por ionización y se considera como una radiación no ionizante.

Para lograr el efecto de las microondas, estas deben acoplarse directamente con las moléculas de la sustancia en exposición, llegando así a un rápido incremento de la temperatura. El resultado de esto es un calentamiento instantáneo de cualquier material que presente conducción iónica o rotación bipolar, siendo un mecanismo fundamental para la transferencia de energía de microondas hacia la materia.

La rotación bipolar hace referencia a una interacción en la cual las moléculas o especies polares intentan alinearse con la rapidez cambiante de dicho campo eléctrico, el movimiento y fricción entre las moléculas origina la transferencia de energía que se convierte en calor. La habilidad de acoplamiento está relacionada con la polaridad de las moléculas y su capacidad de alineamiento (Correa-Cuevas, *et al.*, 2011).

La energía de microondas se deposita directamente en el material calentado, por tanto, el interior del objeto puede calentarse sin mediación de calefacción conductiva y generalmente las temperaturas en el interior de los materiales son mayores que cerca de la superficie.

Con la extracción asistida por microondas se puede incluir el factor de temperatura y mejorar la sinergia entre la polaridad de solventes y el pH. Como consecuencia de la radiación de microondas, se puede obtener una buena velocidad de calefacción y reducción de tiempo de reacción.



## 2.3 Extracción con ultrasonido

La extracción usando la sonicación, está basado en la propagación de ondas mecánicas conformadas por un conjunto de ciclos, definidos como la combinación de altas y bajas presiones, denominadas compresiones<sup>15</sup> y rarefacciones<sup>16</sup> (Awad, 2012; Musielk, *et al.*, 2016). De acuerdo con Tippens (2007), las principales características de la onda de ultrasonidos son: longitud, amplitud, frecuencia (Hz), velocidad (m/s), potencia (W) e intensidad (W/cm<sup>2</sup>).

La extracción asistida por ultrasonido, tiene como principal fuerza impulsora a la cavitación acústica, capaz de inducir una serie de compresiones y rarefacciones en las moléculas del solvente. Esto, provoca la formación de burbujas como consecuencia de los cambios de temperatura y de presión (Shirsath, *et al.*, 2012).

Fernández (2012) expresa que las ondas ultrasónicas dan como resultado la separación molecular formando “micro burbujas” o cavidades (cavitación). Las ondas van influyendo en la formación de las burbujas en función del tiempo. Una vez que la burbuja tiene un tamaño considerable, se desplaza a otro lugar de mayor presión, siendo en este punto donde la burbuja instantáneamente implota, produciendo presiones de unas 500 atm y unos 5 °C de temperatura. Esta presión y temperatura producida en un punto muy pequeño produce la ruptura de las paredes celulares. Además, la onda de choque que produce la ruptura de burbujas rompe la estructura del disolvente, lo que afecta la reactividad al alterar la solvatación de especies reactivas. El ultrasonido además facilita la rehidratación del tejido si se están utilizando materiales secos al abrir los poros, lo cual a su vez incrementa el transporte de masa de los constituyentes solubles por difusión y procesos osmóticos.

---

15 Las regiones densas en las que gran número de moléculas se agrupan acercándose mucho entre sí se llaman compresiones. Una compresión corresponde a una región de alta presión.

16 Las regiones que tienen relativamente pocas moléculas se conocen como rarefacciones y corresponden a zonas de baja presión.

Citando a Chemat (2017), es un mecanismo involucrado es la erosión, que ayuda a mejorar la accesibilidad del disolvente, mediante la implosión de las burbujas sobre la superficie de la matriz vegetal. Por su parte, los efectos de sono capilaridad y de sono poración son capaces de mejorar la penetración de líquido a través de los canales producidos por la implosión de las burbujas, ocasionando alteraciones en la permeabilidad de las membranas celulares.

#### **2.4. Extracción asistida por enzimas**

Los métodos de extracción involucran la difusión<sup>17</sup> de antocianinas, a través de la pared celular, la cual contiene la molécula. Con los métodos convencionales, se logra extraer antocianinas gracias a su solubilidad, se aumenta el rendimiento considerando los factores que favorecen su estabilidad. Sin embargo, analizando el método asistido con ultrasonido, es posible aumentar el rendimiento, una vez que las paredes se han roto. Dentro de este orden de ideas, al romper las paredes celulares el solvente tiene mayor contacto con la molécula.

La extracción de compuestos bioactivos asistida por enzimas, se basa en la polaridad que tienen las enzimas para hidrolizar los polisacáridos de la pared celular y membranas de los vegetales. Como consecuencia de esta hidrólisis se incrementa la formación de poros y su tamaño. Por lo tanto, permite una mejor difusión del solvente a través del tejido de las frutas o vegetales, dando como resultado una mayor y rápida recuperación de los compuestos extraídos (Fernández A., 2012).

Las enzimas tienen la propiedad de catalizar reacciones con gran especificidad y regio-selectividad, sin que interaccionen con el compuesto que se desea extraer. Este método de extracción brinda la posibilidad de realizar la extracción usando tecnologías más limpias para el cuidado de medio. Las enzimas más utilizadas para la extracción son las celulasas, pectinasas, y hemicelulasas, ya que el principal componente estructural de los vegetales es la celulosa. La cual,

---

<sup>17</sup> La difusión es el flujo neto de moléculas desde una región de alta concentración a una región de baja concentración.

funciona en la materia prima vegetal como una barrera estructural que limita la liberación de antocianinas en pétalos de azafrán, extracción de pigmentos en cefalotórax de camarón y extracción de aceites en semillas (Fernández A., 2012; Andrade E., 2015; Lofti, *et al.*, 2015; Rodríguez, 2019).

## 2.5. Determinación de la concentración de antocianinas

Después de extraer las antocianinas, para cuantificar su concentración se utiliza el método de pH diferencial. Las antocianinas dan dos bandas de absorción en la región UV (260-280nm) y la región visible (490-550nm). El método de pH diferencial, permite la estimación alternativa del contenido de antocianinas totales, incluso con la presencia de pigmentos polimerizados<sup>18</sup> y otras interferencias. Como se menciona anteriormente la forma oxonio predomina a pH 1 y el hemiacetal a pH 4.5. Para la obtención de la concentración de antocianinas se utiliza la fórmula de pH diferencia.

$$A_T = (A_{max.vis} - A_{700\ nm})_{pH1} - (A_{max.vis} - A_{700\ nm})_{pH4.5}$$

$$Antocianinas_{Totales} = \frac{A_T * PM * FD * 1000}{\epsilon * 1}$$

Dónde: *PM* = *Peso molecular de la antocianina*

*FD*: *Factor de Dilución.*

$\epsilon$  = *Absorbancia molar de la antocianina.*

La concentración final de antocianinas se obtiene en mg/g, se calcula en base al volumen de extracto y peso de la muestra, se toma en cuenta la dilución que se realiza a partir del extracto (Fernández A., 2012).

---

18 Reacción química mediante la cual se asocian gran cantidad de moléculas pequeñas, llamadas monómeros, para formar una molécula de cadena muy larga llamada polímero (Larousse, 2009).

## **2.6 Cromatografía Líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-ESI-MS)**

La Cromatografía líquida o de gases acoplada a espectrometría, es el método más común para obtener el perfil de antocianinas. Ofrece una poderosa técnica analítica que combina la cromatografía como técnica de separación, y la espectrometría de masas como técnica de detección, identificación y cuantificación para compuestos orgánicos / organometálicos.

La Espectrometría de Masas es una potente técnica instrumental de análisis, de alta sensibilidad. Se basa en la ionización de las moléculas, en la separación y registro de los iones producidos, según su relación masa/carga en un sistema a vacío. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es ampliada, procesada y registrada en un ordenador, dando lugar al correspondiente espectro de masas que no es más que una representación gráfica de la abundancia de los iones detectados en función de su relación masa/carga.

Esta técnica puede aplicarse tanto al análisis cualitativo como al análisis cuantitativo de una muestra, siendo especialmente potente cuando se acopla a una técnica de separación previa como es la cromatográfica.

En su vertiente cualitativa, la Espectrometría de Masas proporciona las herramientas necesarias para la identificación de sustancias, tanto a partir de sus iones, fragmentos que se producen al romper la molécula analizadada, dicho de otra forma, su caracterización estructural, como empleando el valor de su masa medido con una elevada exactitud o composición elemental (Castroviejo-Fernández, 2020).

En lo que respecta al análisis cuantitativo, la intensidad iónica detectada se puede correlacionar con la cantidad de sustancia presente en la muestra, aunque para llevar a cabo una cuantificación absoluta de calidad es necesario disponer de patrones de referencia y llevar a cabo una separación cromatográfica previa (Castroviejo-Fernández, 2020).

En la tabla 3, se muestra un recopilado de las condiciones utilizadas por diferentes autores para la identificación del perfil de antocianinas en la cromatografía de líquidos de alta resolución.

*Tabla 3 Condiciones con diferentes condiciones utilizadas por diferentes autores para la identificación de antocianinas por HPLC – MS.*

Condiciones	Autores		
	(He, <i>et al.</i> , 2016)	(Tanya L, <i>et al.</i> , 2017)	(Fernández A. 2012)
<b>Columna</b>	Lipophilic Sephadex LH-20	Malla Amberlite XAD-7HP 20– 50; Sigma, Saint Quentin Fal lavier	Hypersil Gold (250 x 4.5 mm, 5µm)
<b>Fase móvil</b>	A: Ácido fórmico 0.1% en relación 1:4  B: Ácido fórmico 0.1% en relación 2:1  *	A: Agua: Ácido fórmico 91.5:8.5  B: Ácido fórmico: metanol: acetonitrilo: agua 8.5 : 22.5: 22.5: 41.5	A: Ácido acético 10%  B: Metanol: agua: ácido acético 50:40:10
<b>Flujo</b>	-	1 mL /min.	1.2 mL/min.

### a) Actividad y capacidad antioxidante

Las antocianinas son compuestos antioxidantes por naturaleza ya que contienen compuestos fenólicos, capaces de secuestrar radicales libres, por la presencia de los grupos hidroxilo. Los antioxidantes naturales son apreciados porque pueden ser usados en el diseño de alimentos benéficos para la salud, también conocidos como funcionales o nutraceuticos. La función de los antioxidantes, es frenar las reacciones de oxidación en las células a partir de las cuales se originan los nocivos radicales libres. De acuerdo con la química, la

oxidación de un compuesto, es la pérdida de electrones de hidrógeno y aumenta su estado de oxidación.

Un radical libre es un átomo o molécula que tiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos y es capaz de tener una existencia independiente. Sin embargo, es muy reactivo ya que tiende a reducirse, es decir, sustrae un electrón de átomos o moléculas estables, a las cuales oxida, con el fin de alcanzar su propia estabilidad. Los radicales libres en particular y las especies reactivas en general, participan en algunas funciones biológicas, como proliferación celular, diferenciación celular, fagocitosis, metabolismo y reacciones inflamatorias (Quintanar-Escorza, *et al.*, 2009).

De acuerdo con Friedman (1997), los radicales libres son generados durante la respiración y metabolismo celular, siendo responsables de muchas enfermedades degenerativas, cataratas, arterioesclerosis, muerte celular y cáncer, asimismo por su capacidad de eliminar y atrapar potencialmente a los electrófilos dañadores del ADN, metales tóxicos, hasta la inhibición de enzimas activadoras de pre carcinógenos, hasta carcinógenos.

Los radicales libres producidos en cantidades moderadas en los organismos, pueden ser neutralizados por el propio sistema. Ante un determinado insulto oxidativo, los organismos suelen adaptarse rápidamente. En general, una agresión oxidante de baja intensidad hace que una célula pueda resistir posteriormente condiciones más oxidantes. Sin embargo, las especies reactivas de oxígeno que se producen y escapan a los sistemas de defensa, producen continuamente irremediables daños a los carbohidratos, al ADN, proteínas, y lípidos que alcanzan. Las consecuencias de las reacciones de los radicales libres con los diferentes compuestos celulares pueden ser muy variadas, pero siempre de importancia biológica y con consecuencias irremediables a corto, mediano o largo plazo (Quintanar-Escorza, *et al.*, 2009; Youngson, 1994).

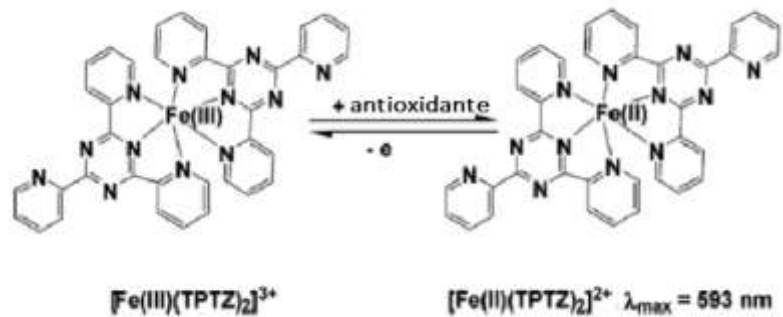
A pesar de que los polifenoles están asociados con varios mecanismos, se cree que su principal modo de acción está relacionado con la alta reactividad hacia

radicales libres. Sin embargo, debe distinguirse entre capacidad antioxidante y reactividad. Mientras que la capacidad antioxidante da información acerca de la duración del efecto antioxidante, la reactividad caracteriza solo la dinámica de inicio del efecto antioxidante a una concentración fija del compuesto (Perón *et al.*, 2001).

La determinación de la capacidad antioxidante de extractos complejos se lleva a cabo usualmente, mediante diferentes métodos complementarios, que evalúen diversos mecanismos de acción. Algunos de los métodos más utilizados, por su simplicidad y reproducibilidad, son: FRAP (potencial antioxidante reductor férrico), DPPH (Difenil Picril Hidrazilo) y ABTS (azinobis 3-etilbenzoatiazolina-6-ácido sulfónico).

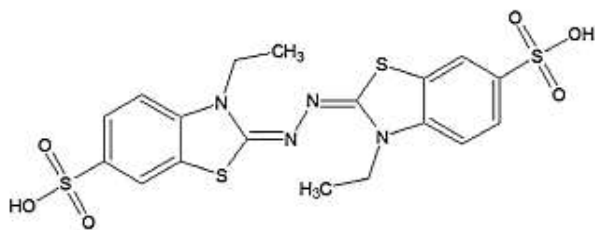
La necesidad de establecer métodos unificados para medir capacidad antioxidante quedó manifestada por el Primer Congreso Internacional sobre Métodos Antioxidantes llevado a cabo en Orlando, Florida, EUA en junio del año 2004. El propósito de esta reunión fue discutir acerca de la forma en la cual se determina la capacidad antioxidante de alimentos, fitoterapéuticos, nutraceuticos y suplementos dietarios (Prior R, *et al.*, 2005).

El método FRAP (Poder antioxidante reductor de hierro, por sus siglas en inglés), se basa en el principio de que los antioxidantes son sustancias capaces de reducir el ion férrico ( $Fe^{+3}$ ) al estado ferros ( $Fe^{+2}$ ), en esta forma, el ion forma un complejo coloreado con el compuesto TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina). Se genera una coloración azul, de intensa proporcionalidad a la capacidad reductora de la muestra (complejo ferroso-TPTZ) (Figura 13) que puede cuantificarse por colorimetría a 593nm en base a un patrón de sulfato ferroso. El método FRAP es, por tanto, un método que no evalúa la capacidad neutralizadora de los radicales libres de la muestra estudiada, sino su capacidad reductora por transferencia de electrones (Mercado-Mercado, *et al.*, 2012; Penarrieta, *et al.*, 2008).



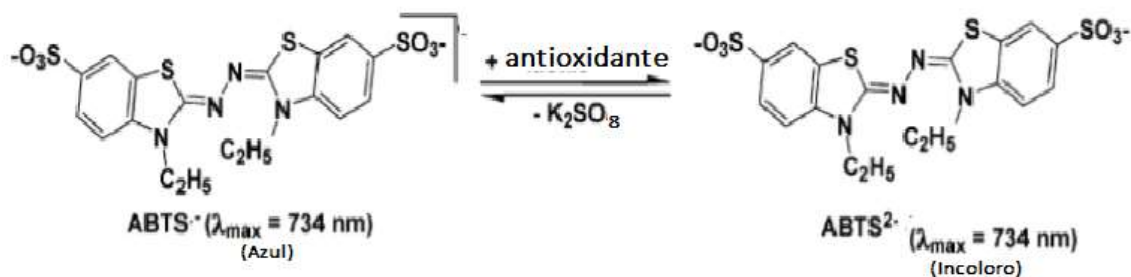
**Figura 13** Reacción del complejo cromóforo de hierro tras actuar el oxidante sobre este (Pasando de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ ) (Huet-Breña, 2017).

El método de ABTS (La capacidad de absorción del oxígeno radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico)) (Figura 13.1). El ensayo se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical  $\text{ABTS}^*$ , el cual tiene un pico de absorbancia a 734nm y es un cromóforo verde azulado, que decrece en intensidad con la presencia de antioxidantes. En cuanto a la generación del radical ABTS, consiste en la reacción entre ABTS y persulfato de potasio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) (Figura 13.3). La reacción con los antioxidantes reduce el radical a ABTS, decreciendo la coloración a 734nm. La decoloración dependerá del tipo de antioxidante, concentración o del tiempo de la reacción. La reacción en la medida de la absorbancia permite conocer la capacidad antioxidante de la muestra en cuestión. (Penarrieta, *et al.*, 2008; Cañada-Blanca, 2019).



**Figura 14.1** Estructura química del ABTS

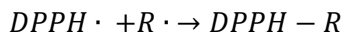
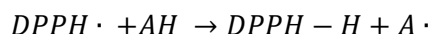




**Figura 15.2 Estructura de ABTS+ antes y después de la reacción con el antioxidante (Cañada-Blanca, 2019).**

Y por último el Difenil Picril Hidrazilo, o DPPH (Figura 14), es un indicador para medir la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidante. Consiste en la medición de la capacidad de los antioxidantes para captar el radical DPPH\* por medio de la disminución de la absorbancia (515nm), va perdiendo el color violeta debido a la deslocalización del electrón desapareado (Figura 14.1).

Su mecanismo de acción consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno proveniente de un donador, por ejemplo, del compuesto fenólico para así generar el compuesto difenilpicrilhidrazila y una especie radical. La reacción de ensayo químico in vitro, desarrolla un cambio de color violeta a amarillo a medida que disminuye la absorbancia a 515nm, la reducción de DPPH\* sigue la siguiente reacción: (Brad-Williams, *et al.*, 1995).



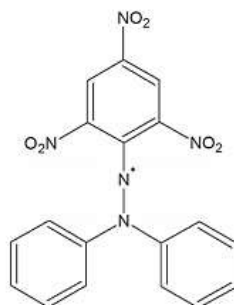


Figura 16 Estructura química del radical libre meta estable DPPH

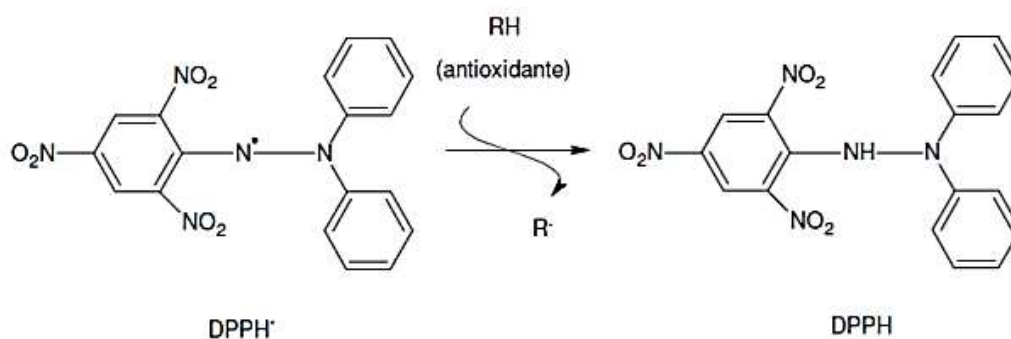


Figura 17.1 Reacción entre el radical DPPH• y un antioxidante (Cañada-Blanca, 2019).

Los métodos ABTS y DPPH, al contrario del método FRAP, evalúan la capacidad de la muestra para neutralizar radicales libres modelo. El DPPH es un radical libre estable soluble en metanol que es neutralizado mediante un mecanismo de transferencia de hidrógeno. Por otra parte, el ABTS es generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobina) o electroquímica y su mecanismo de neutralización es principalmente por transferencia de electrones. En el método ABTS, también conocido en la literatura científica como el método TEAC (Capacidad antioxidante en equivalentes de trolox, por sus siglas en inglés) se puede medir la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos; en cambio, el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico por lo que mide preferentemente

la capacidad antioxidante de compuestos poco polares (Mercado-Mercado, *et al.*, 2012).

La tabla 4, es la extensión de la tabla 3 modificada, contiene los resultados con mayor eficiencia en la extracción por solventes y reporta la actividad antioxidante de antocianinas, realizado por Rasha, en el (2016). Se puede observar que el autor hace uso de los 3 métodos antes mencionados, y reporta valores que varían muy poco entre sí. Es notable como la actividad antioxidante coincide con la cantidad de antocianinas obtenidas en las diferentes condiciones.

*Tabla 4. Contenido de antocianinas y actividad antioxidante de extracto de Hibiscus con diferentes concentraciones de solventes acidificados (Modificado de Rasha K, et al., 2016).*

Condiciones de extracción de Antocianina	Antocianinas (mg/100 g)	Actividad Antioxidante (AOA) (mg/g)		
		DPPH	ABTS	FRAP
Agua (0% Etanol)	572.54 ± 9.38	28.82 ± 0.28	30.71 ± 0.80	28.70 ± 0.70
50 % Etanol	640.03 ± 1.61	45.01 ± 0.40	44.84 ± 0.20	46.66 ± 0.16
80 % Etanol	485.90 ± 4.80	19.73 ± 0.28	18.30 ± 0.57	18.18 ± 0.19
Agua acidificada (1% HCl)	648.75 ± 13.00	46.70 ± 0.80	47.37 ± 0.20	43.55 ± 0.20
50 % Etanol + 1% HCl	685.78 ± 1.93	52.45 ± 0.47	52.69 ± 0.70	49.10 ± 0.18
Agua acidificada (2% ácido acético)	634.90 ± 4.25	44.64 ± 0.74	45.54 ± 0.15	43.20 ± 0.15
2 % ácido láctico en 80 % Etanol	725.91 ± 4.14	55.38 ± 0.47	56.41 ± 0.18	51.80 ± 0.60

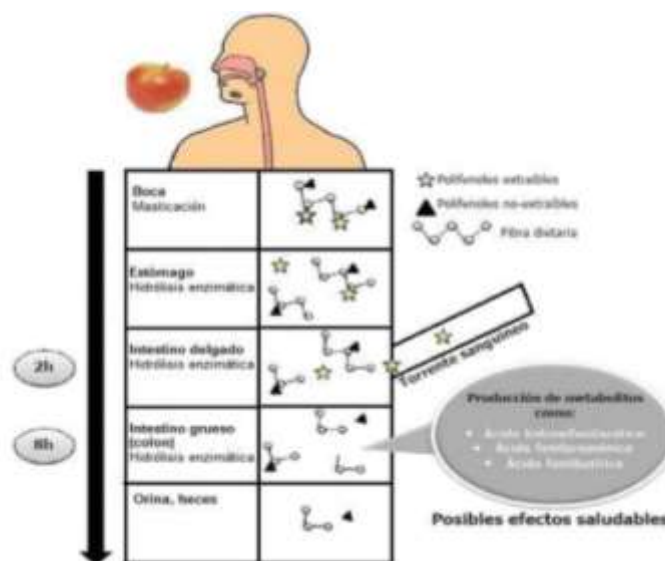
### **a) Mecanismo antioxidante en el cuerpo**

Para inhibir la reacción de los radicales libres con las células del cuerpo es necesario tener disponibles sustancias que realicen la función de antioxidante (Chasquibol *et al.*, 2003).

Un par de parámetros importantes que se deben considerar, son la Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de las antocianinas. La bioaccesibilidad está definida como la cantidad de compuestos que se obtienen desde la matriz alimenticia durante la digestión gastrointestinal y que están disponibles para ser

absorbidos por el intestino. Por otro lado, la biodisponibilidad se define como la proporción de nutrientes en el alimento ingerido que resulta accesible para su utilización en procesos metabólicos. En el caso de los nutrientes minerales, la biodisponibilidad está determinada en primera instancia por la eficiencia de la absorción desde el lumen intestinal a la sangre (Fennema, 2000). Por lo tanto, para que los compuestos fenólicos sean potencialmente biodisponibles, primeramente, deben estar bioaccesibles en la matriz del alimento (Tagliazucchi, *et al.*, 2010).

Se debe tener en cuenta que la bioaccesibilidad y posterior absorción de los compuestos fenólicos impacta directamente por el tipo de matriz alimentaria de donde provengan. En la Figura 15, se observa como interfiere en la bioaccesibilidad la fibra dietética de las frutas. Los compuestos fenólicos tanto los extraíbles como los no extraíbles están unidos a la fibra, y por acción de las enzimas y pH presentes en la fase gástrica e intestinal se liberan los polifenoles extraíbles, los que pueden ingresar al torrente sanguíneo, en tanto que los no extraíbles siguen unidos a la fibra y en el intestino grueso por acción de las bacterias presentes pueden lograr la liberación de algunos compuestos y los que no pueden ser liberados son excretados en las heces (Quirós, *et al.*, 2012).



**Figura 18 Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de compuestos fenólicos asociados a la fibra.**

## Capítulo 3

### Jamaica

#### 3.1 Antecedentes

Una de las flores con gran potencial para la extracción de antocianinas es la flor de jamaica. Es un hibisco de la familia de las Malváceas, proveniente de África y Asia tropical. Su nombre científico es *Hibiscus sabdariffa* L., es conocida comúnmente como: rosa de Jamaica, flor de dardo, rosa de Jericó, té rojo, flor roja y Jamaica. El nombre de Jamaica se debe a su origen, cuando la flor llegó al continente americano ingresó por la isla Jamaica. Consiste en una planta herbácea anual que puede alcanzar de 2 a 4 metros de altura. Es propia de climas secos tropicales y subtropicales (Cevallos Mina, 2015). El fruto o infrutescencia consiste de un ápice cónico o cáliz, de color rojo brillante a oscuro, el cual está conformado por cinco a siete sépalos ovalados que alcanzan de dos a tres centímetros de largo.

De acuerdo con Mina (2015) y Belén (2021), la gran cantidad de cultivos de Jamaica existentes ha dado lugar alrededor de 200 variedades o tipos de esta planta con flor. A nivel internacional se distinguen seis variedades, destacándose: la variedad Sudán, la china o morada, la roja también conocida como larga y corta (Americana), la negra gigante (Nigeriana), la morada gigante (Tailandesa) y la no ácida (Vietnam). La composición proximal en los cálices de jamaica puede cambiar, dependiendo de la variedad genética, tipo de suelo de cultivo y variedad de color.

Mina (2015), da a conocer que en un principio esta planta se cultivó para obtener la fibra que se extrae de sus duros tallos. Se utilizaba como sustituto del yute utilizado para hacer arpillera<sup>19</sup>. Más tarde, los cálices de la planta se emplearon como colorante alimentario, sobre todo en Alemania. En el Caribe, el té se prepara a partir del fruto fresco y se toma en Navidad. En Trinidad y Tobago se

---

19 Tejido generalmente de estopa, yute u otro tipo de fibra similar, que es basto, fuerte y áspero; se utiliza sobre todo para hacer sacos y cubrir bultos en almacenes o transportes.

produce incluso una bebida, denominada Shandy Sorrel, que combina este té con cerveza. En América Central se toma como bebida refrescante o como infusión caliente, y con ella se preparan también mermeladas, dulces, jarabes y otros refrescos. En México es muy popular tomar té frío, como acompañamiento de la comida y se conoce como Agua de Jamaica. En la provincia de Misiones, Argentina, se la conoce como Rosella, y se utiliza para preparar una mermelada, hecha hirviendo los cálices frescos con azúcar. Cabe resaltar que las bebidas de Jamaica son de color rojo vino, debido a su contenido de antocianos.

En la actualidad los cálices deshidratados de jamaica son apreciados comercialmente porque a partir de estos pueden obtenerse extractos concentrados de color rojo con aplicación en la industria alimenticia y farmacéutica en la elaboración de tintes y saborizantes de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos, y con la flor también se obtienen harina para galletas (Galicia-Flores, *et al.*, 2008).

### 3.2 Composición química de la flor de jamaica

La planta de jamaica puede ser considerada una buena fuente de nutrientes debido al contenido de proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales distribuidos en diferentes proporciones. Esto depende de la porción de la planta y el grado de maduración de los frutos (James, 1983), por esta razón, los valores indicados en la literatura no son homogéneos. En la tabla 5 se muestran datos obtenidos mediante diversos autores sobre la composición de macronutrientes de los cálices carnosos rojos y en base seca.

Tabla 5. Composición química en macronutrientes para 100 g de la porción comestible de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) referida a varios autores.

Componente (%)	Cálices carnosos					
	(Morton, 1987)	(Morton, 1987)	(Babalola, <i>et al.</i> , 2001)	(Duke, 1983)	(Suliman, <i>et al.</i> , 2011)	(Aregbesola, <i>et al.</i> , 2016)
Humedad (%)	9.20	86.50	86.50	84.50	11.00	15.28
Proteína cruda (%)	1.15	17.40*	17.40*	1.90	7.88	4.59
Grasa cruda (%)	2.61	2.10*	2.10*	0.10	0.16	-

Fibra Cruda (%)	12.00	8.50*	8.50*	2.30	13.20	7.90
Cenizas (%)	6.90	6.50*	6.5*	1.20	10.60	6.92
Carbohidratos (%)	68.15	65.50*	-	10.2	57.16	64.26

**\*Valor reportado en base seca.**

Los macronutrientes que se encuentran en mayor porcentaje son los carbohidratos seguidos por cenizas, proteínas y grasas, presentan una cantidad importante, el ácido málico que junto con sus derivados pueden usarse con fines medicinales. En la tabla 6, se muestran los datos de un estudio que incluye las cantidades de los ácidos grasos presentes. Toda la planta en general, posee un valor nutritivo por el contenido de proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y oligoelementos, motivo por el cual se obtienen varios productos. Por ejemplo: de la raíz se pueden obtener vinos, del tallo y hojas se pueden consumir crudos o cocidos, debido a que ambas son ricas en fibra, de los cálices se obtiene té, refrescos, gelatinas y postres, las flores son usadas para ensaladas, jaleas y mermeladas y los frutos o semillas son utilizados en la elaboración de aceites para sopas, salsas y harina desgrasada. También se utiliza como alimento para aves y como abono orgánico. Con la fibra se elaboran cordones que sustituyen al cáñamo o al yute (Cevallos-Mina, 2015).

*Tabla 6. Composición nutricional de cáliz de jamaica (Hibiscus sabdariffa L.) (Jabeur, et al., 2017).*

Valor Nutricional		Ácidos grasos (%)	
Cenizas (g/100 g)	7.4 ± 0.5	Ácido cáprico (C 6:0)	0.40 ± 0.02
Proteínas (g/100 g)	5.5 ± 0.4	Ácido caprílico (C 8:0)	0.14 ± 0.01
Grasa (g/100 g)	0.47 ± 0.08	Ácido cáprico (C10:0)	0.220 ± 0.001
Carbohidratos (g/100 g)	87 ± 1	Ácido láurico (C 12:0)	0.47 ± 0.03
Energía (cal/100 g)	373 ± 2	Ácido mirístico (C 14:0)	1.24 ± 0.01
Azúcares (g/100 g)		Ácido pentadecanoico (C15:0)	0.84 ± 0.01
Fructuosa	4.6 ± 0.3	Ácido palmítico (C 16:0)	27.73 ± 0.02
Glucosa	6.5 ± 0.6	Ácido palmitoleico (C 16:1)	1.32 ± 0.04
Ácidos Orgánicos (g/100 g)		Ácido heptadecanoico (C 17:0)	1.28 ± 0.06
Ácido oxálico	1.81 ±	Ácido esteárico (C	4.46 ± 0.01

	0.05	18:0)	
Ácido málico	9.10 ± 0.0009	Ácido oleico (C 18:1n9)	9.1 ± 0.1
Ácido siquímico	0.356 ± 0.002	Ácido linoleico (C 18:2n6)	32.65 ± 0.07
Ácido fumárico	0.043 ± 0.0002	Ácido α-linoleico (C 18:3n3)	15.76 ± 0.04
<u>Tocoferoles (mg/100 g)</u>		Ácido araquidónico (C 20:0)	1.02 ± 0.05
<u>α-Tocoferol</u>	39.19 ± 0.06	Ácido eicosanoico (C 21:0)	0.21 ± 0.02
<u>β-Tocoferol</u>	0.76 ± 0.06	Ácido behénico (C 22:0)	1.40 ± 0.02
		Ácido tricosanoico (C 23:0)	0.67 ± 0.01
		Ácido lignocérico (C 24:0)	1.08 ± 0.02
		Ácido grasos saturados	41.2 ± 0.1
		Ácidos grasos mono saturados	10.4 ± 0.2
		Ácidos grasos poliinsaturados	48.4 ± 0.1

Entre los compuestos más destacados de los cálices de la *Hibiscus sabdariffa* se encuentran ácidos orgánicos, como el cítrico, málico y ascórbico. También se encuentran compuestos glucosídicos fenólicos como la antocianina, (Tabla 6 y 7) a la cual se le otorga la mitad de toda la acción antioxidante de la planta. Los ácidos orgánicos con mayor abundancia son el ácido cítrico, ácido hidroxicítrico, ácido hibisco, málico y tartárico y los que se encuentran en menor cantidad son el ácido oxálico y ascórbico. Los compuestos volátiles en el cáliz son los responsables del aroma en los extractos acuosos donde se han obtenido un total de 32 compuestos volátiles derivados de 5 grupos químicos: aldehídos, alcoholes, cetonas, terpenos y ácidos de los cuales los primeros dos grupos son los que contienen la mayor fracción de los compuestos volátiles aromáticos de las bebidas (Guerrero-Cázares, 2018).

*Tabla 6. Principales constituyentes de extracto acuoso de cáliz de jamaica (Hibiscus sabdariffa L.) (Da-Costa-Rocha, et al., 2014).*

CLASE	COMPUESTO	CLASE	COMPUESTO
Ácidos Orgánicos	Ácido hidroxicítrico Ácido hibiscus	Flavonoides y ácidos	Queratin-3-sambiósidio Queratin-3-rutinósido



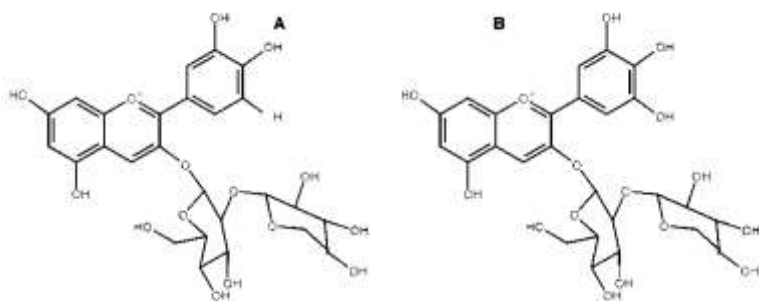
	Ácido hibiscus glucósido	fenólicos	Ácido 5-O-Caffeoilshikimico
	Ácido hibiscus 6-metil éster		Quercetina3-glucósido
<b>Antocianinas</b>	<b>Delfidina-3-sambubiósido</b>		Keamperol-3-O-rutinósido
	<b>Cianidina-3-sambubiósido</b>		Derivado de feruloil
Flavonoides y ácidos fenólicos	Ácido gálico		Metil (AS en metilpigalocatequina)
	Isómero I de ácido clorogénico		Miricetina
	Ácido clorogénico		N-Feruloiltiramida
	Isómero II de ácido clorogénico		Ácido 4-Cafeoilquinico
	5-Hidroximetilfurfural		Isómero de Ácido cafeoilquinico
	Metil galato		Kaempferol-3-p-cumarilglucosidico
	2-O-trans-Caffeoil-ácido-hidroxicátrico		Quercetina
	Ácido 5-cafeolquinico		Ácido cafeico
	Miricetin-3-arabinogalactosido		Ester de galio
	Ácido 3-cafeoilquinico		Derivado de ácido feruloilquinico
	Ácido protocatecuico		Kaempferol-3-glucósido (astragalina)
	Ácido protocatecuico glucósido		Derivado de Quercetina
	Ácido coumaroilquinico		Tilirosida

En la tabla 8 se puede observar el contenido de aminoácidos presentes en los cálices. Estos aportan la mayoría de los aminoácidos esenciales, a excepción del triptófano (Flores, *et al.*, 2008). Por otro lado se ha identificado una apreciable cantidad de compuestos bioactivos, como compuestos fenólicos, ácidos orgánicos, pro-antocianidinas, flavonoles, flavonas, flavononas, isoflavononas y antocianinas y otros agentes antioxidantes como tocoferoles, carotenoides y vitamina C que tienen un efecto neutralizador de la acción oxidante de los radicales libres (Galicia-Flores, *et al.*, 2008; Salazar-González, *et al.*, 2012).

**Tabla 7. Contenido de aminoácidos (mg/g de materia seca) de cáliz de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.).**

Aminoácidos	Morton (1987)	Glew, <i>et al.</i> , (1997)	Aminoácidos	Morton (1987)	Glew, <i>et al.</i> , (1997)
Ácido aspártico	16.30	10.50	Serina	3.50	2.65
Ácido glutámico	7.20	8.85	Isoleucina	3.00	2.70
Prolina	5.60	5.82	Treonina	3.00	2.36
Leucina	5.00	4.21	Tirosina	2.20	1.44
Lisina	3.90	2.77	Histidina	1.50	1.19
Glicina	3.80	2.47	Cistina	1.30	0.87
Valina	3.80	3.33	Metionina	1.00	0.65
Alanina	3.70	3.46	Fenilalanina	1.00	2.32
Arginina	3.60	4.48			

Los cálices de flor de Jamaica se caracterizan por una elevada concentración de antocianinas como la delfindina-3-sambubiósido y cianidina -3- sambubiosido (Figura 16) (Cisse, *et al.*, 2009; Babalila. 2011; Tsai, *et al.*, 2002; Tsai, *et al.*, 2004). La figura 17 ilustra una cromatografía de la separación de antocianinas en *Hibiscus sabdariffa* por HPLC, delfinidin-3-O-sambubiósido, delfinidin3-O-glucósido y cianidin-3-O-sambubiósido, reportados en (Salazar-González, *et al.*, en el 2012).



**Figura 16 Representación de la estructura de las antocianinas presentes en el pigmento de la flor de jamaica. A) cianidina-3sambubiosido y B) delfidina-3-sambubiosido.**

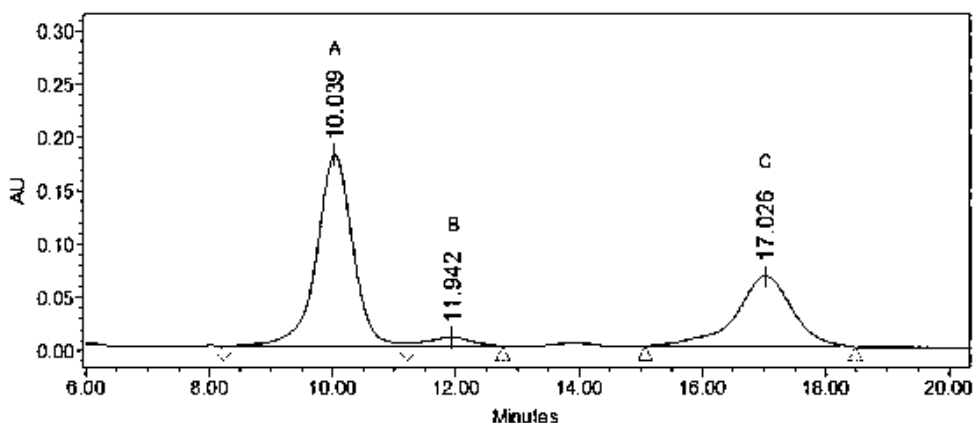


Figura 19 Principales antocianinas en un extracto de etanol: agua (50: 50%, v / v) de la flor de Jamaica, evaluado por HPLC a 520 nm. A) delfinidina-3-O-sambubiósido, B) delfinidina-3-O-glucósido y C) cianidina-3-O-sambubiósido (Salazar-González, *et al.*, en el 2012).

De acuerdo a la información de las tablas anteriores es importante resaltar el término ampliamente utilizado de “polifenoles totales” por lo general se refiere solamente a la fracción de polifenoles extraíbles. Los polifenoles extraíbles son compuestos fenólicos monoméricos, y algunas fracciones poliméricas. Asimismo, la mayoría de los datos reportados en la literatura corresponden a polifenoles extraíbles, siendo generalmente ignorada la fracción de polifenoles no extraíbles (Saura, *et al.*, 2007). Los polifenoles no extraíbles son compuestos de alto peso molecular como taninos hidrolizables y pro antocianidinas. También son polifenoles que no son extraídos por los solventes usualmente empleados para la extracción. Estos permanecen en los residuos de extracción asociados a las paredes celulares o a los compuestos no digeribles de la dieta, o dicho de otra manera a la fracción indigestible.

En la tabla 9, se indica el contenido de compuestos polifenólicos de los cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. de acuerdo con Ayerdi (2010), supone alrededor del 6 % sobre materia seca. Es interesante observar que la mayor parte corresponde a polifenoles no extraíbles con disolventes acuosos orgánicos. El resto de polifenoles corresponde principalmente a antocianidinas, ácidos hidroxicinámicos y ácidos hidroxibenzoicos.

Tabla 8. Contenido en compuestos polifenólicos de cálices de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L) (g/100 g de materia seca) (Sayago A., et al., 2007).

Contenido en compuestos polifenólicos de cálices de la flor de jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L) (g/100 g de materia seca)	
Polifenoles extraíbles	2.17 ± 0.04
Ácidos Hidroxibenzoicos	32.60
Ácidos Hidroxicinámicos	30.60
Antocianidinas	30.80
Flavonoles	5.87
Polifenoles no extraíbles	
Proantocianidinas (taninos condensados)	3.38 ± 0.06
Polifenoles hidrolizables.	0.58 ± 0.03

De acuerdo con Peng-King (2002); Galicia (2008); Abou (2011), el cáliz de jamaica contiene de 364.98 mg/100g a 622.91 mg/100g de antocianinas. Expresados en: mg de delfidina-3-glucósido/100 g de base seca (Figura 18) y mg de cianidina-3-glucósido/100g de base seca (Figura 19) de cáliz de jamaica (Tabla 10). Así mismo se menciona que son resultados obtenidos de acuerdo a análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Sin embargo, se puede observar que los resultados presentan una variación, esto es debido diferentes factores, uno de ellos es que los extractos fueron cuantificados utilizando diferentes disolventes. Por ejemplo, en el estudio de Galicia, *et al.*, (2008) reportan que el extracto fue obtenido utilizando metanol acidificado al 1% con ácido trifluoracético.

Debido a esta pequeña variación entre los resultados obtenidos en los estudios mencionados, se debe considerar como factor importante los disolventes utilizados y la proporción en cuanto a la cuantificación de antocianinas en HPLC. Ver Capítulo II, Tabla 3 “*Condiciones con diferentes condiciones utilizadas por diferentes autores para la identificación de antocianinas por HPLC*”. En donde se

muestran las condiciones usadas por He (2016), Tanya (2017) y Fernández A. (2012), quienes obtuvieron resultados satisfactorios.

Salazar (2012), revela mediante el uso de diferentes polaridades la presencia y concentración de antocianinas. Reporta 132.6 mg expresados como mg de delfidina-3-O-sambubiósido/100 g. Siendo esta la que se encuentra en mayor cantidad, seguida de 74.8 mg de cianidina-3-O-sambubiosido/100 g y por último 7.7 mg de delfidina-3-O-glucósido/100 g de flor de jamaica (Tabla 11). El autor utilizó como único factor de extracción la polaridad, siendo la mezcla de etanol: agua, en una proporción 50:50 como el mejor sistema para extraer los 3 tipos de antocianinas.

Tabla 9. Antocianinas en mg/ 100 g base seca de cáliz jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) referida a varios autores.

Reportada como:	Antocianinas (mg/100 g)		
	Peng-Kong, <i>et al.</i> , 2002.	Galicia, <i>et al.</i> , 2008.	Abou, <i>et al.</i> , 2011
Delfidina-3-glucósido (Figura 18)	2520 ± 50	364.98 – 606.67 172.58 – 296.99 *	-
Cianidina-3-glucósido (Figura 19)	-	-	622.91 ± 2.0

\*Cáliz de jamaica enteros y frescos

Tabla 10. Caracterización de antocianinas extraídas de cálices de la flor de jamaica (Salazar-González, *et al.*, 2012).

Condiciones de extracción de Antocianina	Concentración (mg/100 g)		
	Delfidina-3-O-Sambubiosido	Delfidina-3-O-Glucósido	Cianidina-3-O-Sambubiosido.
Etanol: Agua (50:50)	132.6 ± 21.2	7.7 ± 0.6	74.8 ± 9.1
Etanol: Agua (70:30)	79.7 ± 13.6	4.6 ± 1.7	45.7 ± 9.1
Agua	54.7 ± 6.8	3.1 ± 0.4	30.6 ± 3.9
Etanol	18.6 ± 2.2	1.0 ± 0.2	10.9 ± 1.3

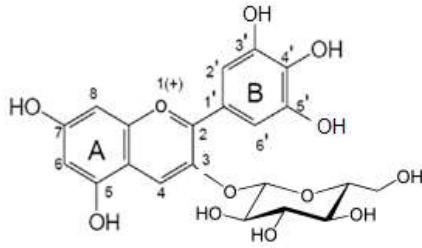


Figura 18 Delfidina-3-glicósido.

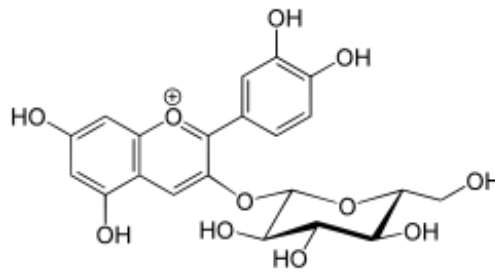


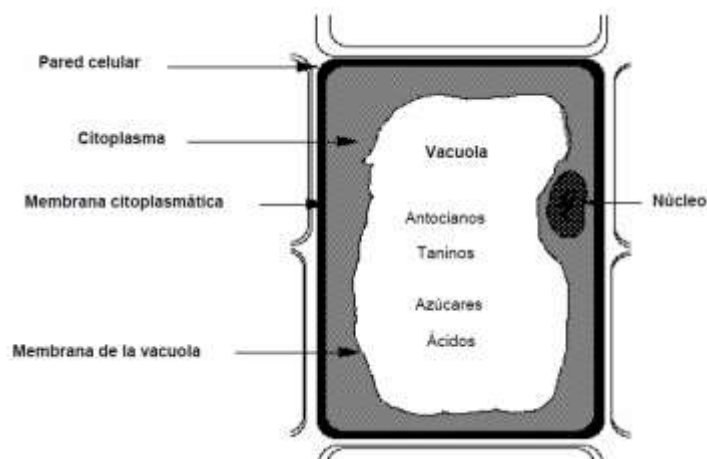
Figura 19 Cianidina-3-glucósido.

### 3.3 Localización de antocianinas en la pared celular

Las antocianinas se localizan tanto en los cálices de jamaica como en las hojas, en las tres o cuatro primeras capas celulares, sobre todo al final del ciclo vegetativo. La síntesis de antocianinas ocurre en el citoplasma de la célula, cerca del retículo endoplásmico se localiza el conjunto de enzimas que participan en el proceso. Formada la antocianina, se deposita en la vacuola (Figura 20), mediante un fenómeno de transporte, una vez dentro las antocianinas se localizan en pequeños cuerpos esféricos conocidos como antocianoplastos<sup>20</sup>. Dentro de los tejidos vegetales se tiene un pH típico entre 3.5 y 5.5 (Fernández A. 2012).

Además de ser almacenados en la vacuola, los flavonoides se acumulan en otros compartimentos celulares incluyendo el citosol, el retículo endoplásmico, cloroplastos, núcleo, vesículas pequeñas y el espacio extracelular (Lepiniec, *et al.*, 2006; Braidot, *et al.*, 2008).

<sup>20</sup> Los antocianoplastos transportan antocianinas hacia la vacuola de la fusión con compartimentos pre vacuolar (Pérez-Díaz, 2013).



**Figura 20 Representación esquemática de la localización de antocianinas a nivel sub-celular.**

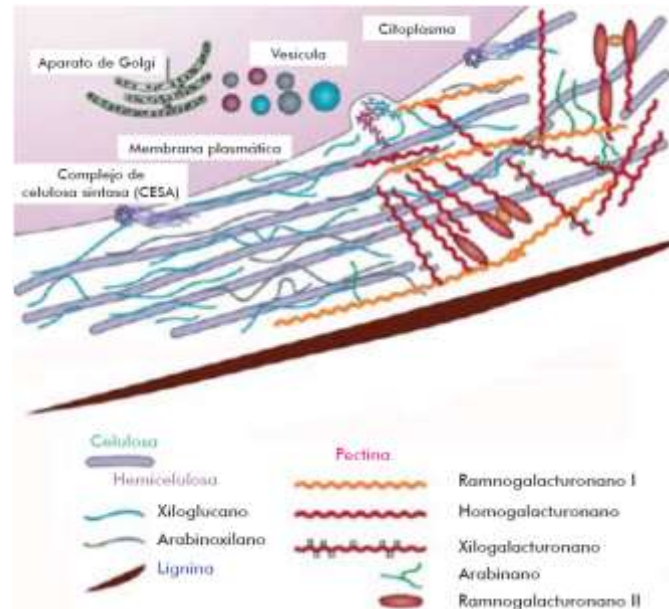
### **3.3.1 Propiedades fisicoquímicas y composición proximal de la pared celular de la flor de jamaica.**

Resaltando que la síntesis de antocianinas ocurre en el citoplasma de la célula y una vez formada la antocianina es depositada en la vacuola. Se comprende mejor lo que implicaría atravesar la pared celular de la flor de jamaica durante la extracción. Sin embargo, no se debe olvidar la importancia de conocer la composición química de la pared celular.

La pared celular vegetal es una estructura altamente organizada, está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y el polímero fenólico lignina (Figura 21). Al conocer la composición química de la pared celular de jamaica se tendrá un mejor criterio en la selección de enzimas. Las cuales se encargarán de romper los enlaces específicos en condiciones óptimas.

La composición de la pared celular y porcentajes de los polímeros varían entre las especies de plantas, incluso en una misma planta, de acuerdo con la edad, el tejido y la etapa de crecimiento. La estructura de la pared celular está formada de manera que pueda desarrollar gran resistencia a la tensión, así como de dar forma a la célula y conferirle resistencia contra agentes patógenos; al tiempo que debe mantener una flexibilidad razonable contra las fuerzas de

rompimiento y un grado mínimo de permeabilidad para que las moléculas señalizantes puedan entrar a la célula (Levy, *et al.*, 2002).



**Figura 21 Composición de la pared celular vegetal. Formada básicamente por los polímeros de celulosa, hemicelulosa, pectina y el polímero fenólico de la lignina (Rosa E., *et al.*, 2001).**

La celulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas, pudiendo representar un 90% de la pared, mientras que las proteínas suponen alrededor del 10% (Zarra, *et al.*, 1993). De acuerdo a la tabla 13, en la pared celular de la flor de jamaica, la celulosa representa un 56.25 - 80.5%. La celulosa en dependencia de su origen, puede tener un grado de polimerización de alrededor de 2,000 a 25,000 unidades de glucosa (Levy, *et al.*, 2002; Hildén, *et al.*, 2004). Está compuesta por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4, que forman moléculas de celobiosa (dímero de glucosa unido por un enlace  $\beta$ -1,4). Estas, a su vez, se estructuran en filamentos de celulosa no ramificados (Pérez J., *et al.*, 2002).



Tabla 11. Composición proximal y propiedades fisicoquímicas de flores *Hibiscus sabdariffa* L. secas (Rasha K, et al., 2016)

Composición Proximal (%)	%	Propiedades fisicoquímicas	Valor
Humedad	11.05 ± 0.24	pH	2.80 ± 0.05
Proteína	5.18 ± 0.03	Acidez titulable (como % ácido cítrico)	3.87 ± 0.10
Grasa	1.70 ± 0.10	Total de sólidos solubles (° Brix)	4.8 ± 0.10
Cenizas	9.22 ± 0.13	Ácido Ascórbico (mg/100g)	46.47 ± 0.31
Fibra	14.67 ± 0.15	Fenoles totales como ácido gálico (mg/100g)	128.60 ± 3.56
Carbohidratos totales	75.85 ± 0.01	Total de antocianinas como cianidina-3-glucosido (mg/100g)	572.54 ± 9.38

Tabla 12. Composición química de la pared celular de la flor de jamaica.

Componente	(Prya-Dasan S., et al., 2013).		(Onggo H., et al., 2007)	(Karakoti A., et al., 2018)				
	Fibra cruda	Fibra tratada		Fibra cruda	Fibra tratada alcalino	Fibra explotada con vapor	Fibra blanqueada	Fibra hidrolisis ácida
Celulosa (%)	63.5	81.5	69.38	62.5 ± 3	64.3 ± 3	68.3 ± 2	74.2 ± 3	80.5 ± 4
Hemicelulosa (%)	17.5	4	12.35	16.5 ± 2	14.2 ± 1	12.3 ± 2	8.2 ± 1	4.6 ± 1
Holocelulosa (%)	46	77	-	-	-	-	-	-
Lignina (%)	12	1.5	16.54	12.8 ± 1	10 ± 1	8.9 ± 1	4.7 ± 1	1.5 ± 1
Pectina (%)	-	-	0.32	-	-	-	-	-
Cera (%)	-	-	0.14	-	-	-	-	-
Humedad (%)	2	9	1.27	7.5 ± 1	8 ± 1	8.3 ± 1	8.7 ± 1	9.3 ± 1

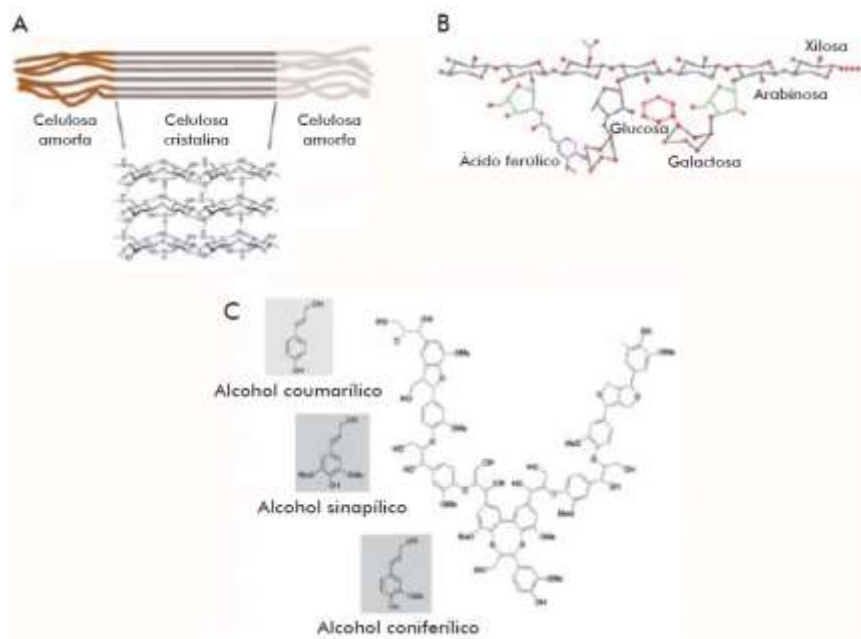
Componente	(Tamta, et al., 2020)		
	Fibra cruda	Fibra desgomada	Fibra blanqueada
Celulosa (%)	56.25	58.63	64.50
Hemicelulosa (%)	11.50	9.70	8.15
Holocelulosa (%)	-	-	-
Lignina (%)	7.25	3.00	1.00
Pectina (%)	-	-	-
Cera (%)	0.50	0.30	.20
Humedad (%)	7.40	8.21	8.76

En la naturaleza, la celulosa no se encuentra como cadena sencilla; desde su síntesis se ordena en filamentos que forman las microfibrillas, con un diámetro de 5 a 15nm. Estas fibrillas pueden contener desde 36 hasta más de 1,200 filamentos de celulosa. La configuración del enlace  $\beta$  glucosídico facilita que la celulosa forme cadenas largas y lineales unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, que forman una estructura cristalina y organizada resistente a la hidrólisis en ciertas áreas de la micro fibrilla (Figura 22 A) (Pérez J., et al., 2002). Las regiones cristalinas altamente organizadas están separadas por celulosa no organizada o amorfa que se presenta en pequeños porcentajes de 5 a 20%. En esta última conformación, la celulosa es más susceptible a la degradación enzimática (Atalla R., 1993; Béguin P., 1994).

La celulosa es un sustrato muy resistente, que se encuentra entrelazado, a su vez, con la hemicelulosa y la lignina, formando una estructura altamente resistente a la degradación. Por lo que solo algunos organismos celulolíticos pueden hidrolizarla (Hildén, et al., 2004).

La hemicelulosa constituye entre el 25 y el 30% en peso seco de las paredes celulares, de acuerdo a la tabla 13, en la pared celular de la flor de jamaica, la hemicelulosa representa un 4.0 – 17.5%. Es un polímero complejo de

heteropolisacáridos, formado principalmente por pentosas como la D-xilosa y L-arabinosa y hexosas tales como la D-glucosa, D-manosa y D-galactosa, usualmente acetiladas que forman cadenas ramificadas, además de los azúcares ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 y ocasionalmente por enlaces  $\beta$ -1,3 (Pérez J., *et al.*, 2002). En contraste con la celulosa, la hemicelulosa posee ramificaciones laterales cortas formadas de distintos azúcares que la hacen menos recalcitrante (Figura 22 B) (Martínez A., *et al.*, 2005). Se clasifican en xilanos, xiloglucanos, mananos, glucomananos y glucanos unidos por enlaces  $\beta$ -1,3 o  $\beta$ -1,4. El xilano es el componente más abundante en la hemicelulosa ya que constituye más del 70% de su composición y está formado por la unión  $\beta$ -1,4 de unidades de D-xilosa.



**Figura 22 Estructura de los principales biopolímeros que forman la pared celular vegetal. A) Estructura del homo-polisacárido de la celulosa cristalina y amorfa. B) Estructura del heteropolisacárido de la hemicelulosa, formada por pentosas y hexosas. C) Estructura de la lignina, formada por la polimerización de tres alcoholes fenólicos (Rosa E., *et al.*, 2001)**

Una de las funciones más importantes de la hemicelulosa, es que actúa como conexión entre la lignina y las fibras de celulosa, lo que otorga mayor rigidez a la red celulosa-hemicelulosa- lignina. La lignina y la hemicelulosa se mantienen unidas de manera predominante a través de enlaces del tipo éster entre la

arabinosa de la hemicelulosa y los hidroxilos de la lignina, en tanto que la unión con la celulosa es a través de puentes de hidrógeno (Laureano-Pérez, *et al.*, 2005).

La lignina es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza, después de la celulosa y la hemicelulosa. Es altamente resistente a la degradación química y biológica.

Forma parte de la pared celular, confiriéndole soporte estructural, impermeabilidad y resistencia al ataque de microorganismos. La lignina y la hemicelulosa crean una matriz amorfa donde las fibras de celulosa están embebidas y protegidas de la degradación.

Estructuralmente, la lignina es un heteropolímero irregular, insoluble y ramificado, formado por la polimerización de tres alcoholes aromáticos del tipo fenilpropano: alcohol coumarílico, coniferílico y sinapílico, unidos por enlaces C-C y enlaces del tipo éter entre los anillos aromáticos (Figura 22 C). Este polímero da rigidez y protege a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) (Rosa E., *et al.*, 2001).

Las pectinas son una mezcla compleja de polisacáridos compuestos principalmente de poligalacturonano, el cual incluye homogalacturonano y ramnogalacturonano I (Figura 16). Constituyen alrededor del 35% de las paredes celulares y se encuentran distribuidas de manera desigual; de la lámina media, De acuerdo a la tabla 13, en la pared celular de la flor de jamaica, la pectina representa un 0.32%.

El homogalacturonano está constituido por cadenas sin ramificar de residuos de ácido D-galacturónico unidos por enlaces  $\alpha$ -(1-4), que pueden estar metilesterificados, formando lo que se conoce como zonas “lisas” de las pectinas. El ramnogalacturonano I es un polímero con un esqueleto base de residuos alternados de D-galactosa unidos en  $\alpha$ -(1-4) y L-ramnosa unidos en  $\alpha$ -(1-2) (Lau, *et al.*, 1985).

Si las antocianinas pueden ser extraídas al atravesar a la pared celular, es necesario romper los enlaces de esta estructura con el uso de enzimas

específicas, lo que ayudaría a disminuir el uso de solventes y tiempo de extracción aumentando su rendimiento.

La hidrólisis enzimática de la celulosa implica la acción secuencial de un grupo de enzimas, conocidas como celulasas, que pertenecen a la súper familia de las glicosilhidrolasas, llamadas así porque catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico entre 2 o más hidratos de carbono. Añadiendo la sinergia de las pectinasas.

### **3.4 ENZIMAS**

Las enzimas son proteínas que facilitan las reacciones entre moléculas que pueden reaccionar naturalmente entre sí, pero en presencia de una enzima, la velocidad de la reacción se incrementa de tal modo que ocurre en tiempo de segundos o menos. Las enzimas son catalizadores, es decir, sustancias que, sin consumirse en una reacción, aumentan notablemente su velocidad. No es que hagan factibles las reacciones imposibles, sino que aceleran las que podrían producirse espontáneamente. Esto hace posible que en condiciones fisiológicas tengan lugar reacciones que sin catalizador requerirían condiciones extremas de presión, temperatura o pH (E. Coto, 2003).

Las enzimas son proteínas, polímeros de aminoácidos que tienen una estructura tridimensional definida. Su actividad, que incluye interactuar con el sustrato<sup>21</sup>, depende de su estructura tridimensional. Si ésta se modifica, la capacidad catalítica puede verse perjudicada. Las enzimas tienen cavidades, que conforman el sitio activo, y es donde se acomodan los sustratos para convertirse en productos. En el sitio activo se encuentran residuos de aminoácidos específicos que permiten la interacción con los sustratos y que facilitan el rompimiento y la formación de nuevos enlaces (Ramírez R., *et al*, 2014).

Los sustratos, al interactuar con el sitio activo de la enzima, se encuentran más cerca uno del otro (mecanismo de aproximación) y además se orientan de manera particular (mecanismo de orientación). Es como si los sustratos contaran

---

<sup>21</sup> Molécula sobre la que actúa una enzima.

con una plantilla o molde donde pueden “acomodarse” para encontrarse y reaccionar, en lugar de depender de las colisiones al azar. El sustrato por acción de la enzima es transformado en producto y es liberado del sitio activo, quedando libre para recibir otro sustrato. De esta manera, la presencia de la enzima provee otra forma por la cual procede una determinada reacción química. Generalmente, este mecanismo requiere menos energía y por eso la reacción química procede más rápidamente en presencia de la enzima.

Otra característica muy importante de las enzimas es su especificidad, es decir, qué tan bien pueden reconocer a un sustrato y solo a ese sustrato, en presencia de otras moléculas. Esta capacidad de diferenciar entre cientos de moléculas es otra de las razones por las que la estructura tridimensional de las enzimas es clave en su funcionalidad. Si la estructura del sitio activo fuera demasiado flexible y dinámica, la afinidad por el sustrato sería muy baja y la reacción no procedería tan rápido (Ramírez R., *et al.*, 2014).

### **3.4.1 Factores que influyen en la velocidad de las reacciones enzimáticas**

Uno de los factores que influyen en la velocidad de las reacciones enzimáticas es la temperatura. Un aumento en la temperatura provoca un aumento de la velocidad de reacción hasta cierta temperatura óptima, ya que después de aproximadamente 45 °C se comienza a producir la desnaturalización térmica. Las enzimas de muchos mamíferos tienen una temperatura óptima de 37 °C, por encima de esa temperatura comienzan a desnaturalizarse. Sin embargo, existen especies de bacterias y algas que habitan en fuentes de aguas termales y, en el otro extremo, ciertas bacterias árticas tienen temperaturas óptimas cercanas a 0 °C.

Otro factor es, el grado de acidez de la solución o bien el pH, este no afecta la actividad enzimática directamente sino que modifica la concentración de protones ( $H^+$ ). Los protones además de alterar la estructura de la enzima y el sustrato, pueden participar también en la reacción como sustrato o producto. En esos casos, la concentración de protones afecta directamente la velocidad de la reacción. Se sabe que las enzimas son proteínas, cualquier cambio brusco de pH,

puede alterar el carácter iónico de los grupos amino ( $\text{NH}_2^-$ ) y carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) en la superficie proteica, afectando así las propiedades catalíticas de una enzima. A pH alto o bajo se puede producir la desnaturalización de la enzima y en consecuencia su inactivación (E. Coto, 2003).

### **3.4.2 Clasificación de enzimas y acción**

Actualmente se conocen más de 5,000 enzimas, algunas trabajan solas y otras necesitan un cofactor. El Comité de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular clasifica a las enzimas en 6 clases, de acuerdo con del tipo de reacción que catalizan tales como: Oxidorreductasas, Transferasas, Ligasas, Liasas, Isomerasas e hidrolasas. Estas últimas añaden agua a una ligadura hidrolizándola (E. Coto, 2003).

Para la extracción de antocianinas provenientes de la jamaica, se deben romper enlaces propios de la célula vegetal. Anteriormente se expuso la composición química de la pared celular de la jamaica, se sabe que está conformada por celulosa, hemicelulosa, lignina, pectinas y todas juntas poseen enlaces como: glucósido  $\beta$ -1,4,  $\beta$ -1,3,  $\alpha$ -1,4,  $\alpha$ -1,2, enlaces tipo éster y enlaces C-C, además de presentar puentes de hidrogeno y fuerzas de Van del Waals.

Por lo que la acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinergista de un grupo de celulasas. Las cuales presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa. En un proceso de extracción asistido por enzimas, son éstas las que pueden provocar la ruptura de la pared celular incluso a nivel molecular. Debido a la efectividad de las enzimas para romper la pared celular, pueden actuar de forma sinérgica con otros solventes este tipo de reacción esta denominado como “Green” o “química verde” (Johnson, 1997).

En la pared celular vegetal, la lignina forma un matriz que envuelve a la celulosa y hemicelulosa. La degradación de lignina es un prerrequisito para la hidrólisis de los demás componentes de la biomasa vegetal. Sin embargo, la hidrofobicidad, la estructura aleatoria, compleja y carente de enlaces hidrolizables comunes, hacen de la lignina resistente a la degradación (Ortíz M., 2009).

Las enzimas que degradan la lignina son oxidativas, inespecíficas y actúa vía mediadores no-proteicos en contraste con las celulasas y hemicelulasas hidrolíticas. Una de las principales enzimas lignolíticas son las lignin peroxidasas, que catalizan una variedad de reacciones oxidativas que son dependientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ortíz M., 2009).

La degradación de la pared celular facilitará la difusión de los compuestos fenólicos contenidos en el interior de las células de los cálices de jamaica. Sin olvidar la importancia de conocer aquellas actividades que pueden contribuir a la degradación de esta barrera natural.

La degradación enzimática de los polisacáridos de la pared celular juega un papel importante en el incremento de extracción. Al degradar los polisacáridos presentes en el tejido, incrementan la formación de los poros, el tamaño del poro y la porosidad total del sustrato. Esto permite una mejor difusión del solvente a través del tejido de en este caso el cáliz de jamaica. Se espera obtener como resultado una mayor y rápida recuperación de los compuestos.

Para hacer uso de las enzimas en el método propuesto, se puede partir de método de extracción por solvente. Para obtener la máxima efectividad de un proceso de extracción acuoso enzimático se requiere de un estudio detallado. Es importante que se considere la naturaleza química del tejido (la jamaica), ya que las enzimas son sumamente específicas. Las condiciones de reacción adecuadas del preparado enzimático como son: pH, temperatura, concentración de enzima, concentración de sustrato, tiempo de reacción y por supuesto el grado de hidrólisis.

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa implica la operación secuencial y la acción sinergista de un grupo de celulasas, que presentan diferentes sitios de enlace, debido a la naturaleza compleja de la molécula de celulosa (Lee, 1997). El sistema de celulosa típico incluye tres tipos de enzimas: la endo- $\beta$ -1,4-glucanasa, la exo- $\beta$ -1,4- glucanasa y la  $\beta$ -1,4-glucosidasa (Celobiosa) (Ladisich, *et al.* 1983; Bataille, *et al.*, 1985; Marsden, *et al.*, 1986; Hahn-Hägerdal, *et al.*, 2000).



### 3.4.2.1 Celulasas

El mecanismo propuesto en la literatura para la degradación de la celulosa puede resumirse en tres etapas: Primero la endo- $\beta$ -1,4-glucanasa actúa al azar sobre los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de celulosa. Después convierte las cadenas largas a oligosacáridos<sup>22</sup> los cuales mantienen la configuración “ $\beta$ ” de su estructura. La acción de esta enzima es sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas. Teniendo como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato para la segunda etapa (Ovando-Chacón, *et al.*, 2005).

En la segunda etapa, actúa la exo  $\beta$ -1,4-glucanasa, la cual es una enzima que corta la cadena 1,4  $\beta$ -D-glucano. A partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, lo que provoca la remoción de unidades de celobiosa<sup>23</sup> o glucosa. Ambas enzimas endo-glucanasa y exo-glucanasa son inhibidas por uno de los productos de la hidrólisis enzimática, la celobiosa, lo que disminuye la eficiencia de la hidrólisis.

Una vez degradada las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis. En donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endo-glucanasa y la exoglucanasa. Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa. Mediante la acción de la  $\beta$ -1,4-glucosidasa, porque las glucanasas son inhibidas por la celobiosa (Ovando-Chacón, *et al.*, 2005).

---

22 Son glúcidos o hidratos de carbono formados por la unión de varios monosacáridos, generalmente entre 3 y 20, unidos por enlaces O-glicosídicos. (Menéndez Valderrey, 2014)

23 Está formada por dos moléculas de D-glucosa unidas por un enlace O-glicosídico entre el carbono 1 de la primera y el 4 de la segunda. . (Menéndez Valderrey, 2014)

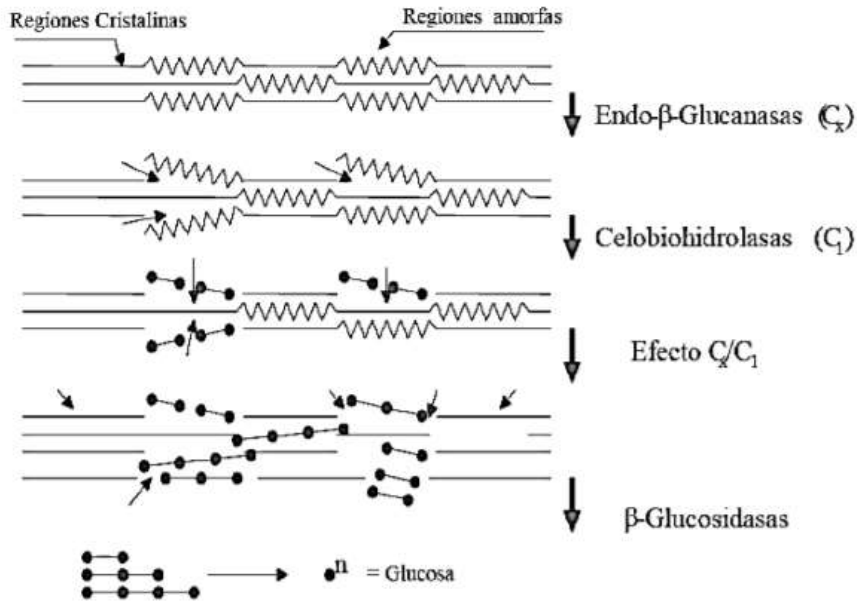


Figura 23 . Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa (Paredes, 2012).

### 3.4.2.2 Hemicelulasas

Las hemicelulasas son macromoléculas que forman asociaciones no covalentes con la celulosa, hidrolizan la hemicelulosa produciendo azúcares simples u oligosacáridos. Esta estructura, es más compleja que la de celulosa, por lo tanto requiere mayor actividad enzimática, debido a la gran variedad de hemicelulosas. El xilano es el principal carbohidrato de la hemicelulosa y su degradación completa requiere la acción cooperada de varias enzimas hidrolíticas como las xilanasas y otras accesorias (Atalla R., *et al.*, 1993). La mayoría de las hemicelulasas son glicósido hidrolasas, aunque algunas hemicelulasas son carbohidrato esterases que hidrolizan los enlaces éster que unen al acetato o al ácido ferúlico con los azúcares ramificados.

Las xilanasas son las principales enzimas que participan en la degradación de la hemicelulosa. En este grupo se encuentran las endoxilanasas que actúan sobre la cadena principal del polisacárido, rompen los enlaces entre las unidades de xilano, y liberan oligosacáridos.

Las enzimas en general son específicas para un tipo de enlaces, por lo que muchas de ellas están involucradas en la degradación de este componente (exo β

1,4-anosidasa;  $\beta$  1,4-xilosidasa; endo- $\alpha$ -1,5-arabinanasa;  $\beta$  galactosidasa; endo  $\beta$  1,4-mananasa;  $\alpha$  galactosidasa;  $\beta$ -glucosidasa; feruloil esterasa;  $\alpha$ -L-rabinofuranosidasa;  $\alpha$ -glucuronidasa; acetilxilano esterasa; endo  $\beta$  1,4-xilanasa) (Rosa E., *et al.*, 2001).

La degradación de la hemicelulosa requiere también enzimas accesorias como las xilano esterases, ferúlico y coumárico esterases,  $\alpha$ -arabinofuranosidasas y  $\alpha$ -4- metil-glucuronosidasas, entre otras, que actúan de manera sinérgica para hidrolizar eficientemente la hemicelulosa (Sánchez C., *et al.*, 2009; Atalla R., *et al.*, 1993).

Entre las hidrolasas también se agrupan unas proteínas llamadas carbohidrato esterases, que catalizan O (oxígeno) y N (nitrógeno) de acetilaciones de sustratos como el xilano, la quitina y algunos peptidoglicanos.

### **3.4.2.3 Peroxidasas**

La despolimerización de la lignina involucra enzimas oxidativas extracelulares que liberan productos altamente inestables y posteriormente sufren reacciones de oxidación (Boerian W., *et al.*, 2003; Pérez J., *et al.*, 2002). Se han caracterizado dos grupos de peroxidasas: la lignino peroxidasa y la peroxidasa dependiente de manganeso, las cuales son oxidorre-ductasas que catalizan reacciones oxidativas de compuestos fenólicos y no fenólicos dependientes de peróxido de hidrógeno necesarias para la degradación de la lignina (Pérez J., *et al.*, 2002).

La lignino peroxidasa es una glicoproteína con un grupo hemo en su centro activo. Es la peroxidasa más efectiva y puede oxidar los compuestos fenólicos y no fenólicos de la lignina, las aminas, los éteres aromáticos y los aromáticos policíclicos (Sánchez C., *et al.*, 2009). La peroxidasa dependiente de manganeso es también una glicoproteína que utiliza el manganeso como sustrato y lo oxida de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$ . Este último es un fuerte oxidante de los compuestos fenólicos de la lignina (Ikehata K., *et al.*, 2004).

#### 3.4.2.4 Pectinasas

Las sustancias pécticas son una mezcla compleja de polisacáridos compuestos principalmente de poligalacturano con grupos carboxilo metilados. Cuando el grado de metilación es superior al 50% se llaman pectinas altamente metoxiladas. La pectina de lámina media de la pared es más soluble que la pectina de las paredes primaria y secundaria y puede ser degradada más fácilmente por las enzimas. El grupo de las enzimas proteolíticas se puede clasificar en función del mecanismo de degradación de las sustancias pécticas. Así, la pectínetrasa cataliza la desesterificación de la pectina y las enzimas despolimerizantes catalizan la escisión del enlace glicosídico  $\alpha$ -(1-4) de la cadena de galacturonano de la molécula de pectina (Batisse *et al.*, 1996; Redgwell, *et al.*, 1997; Waldron, *et al.*, 1997; Viliers, *et al.*, 2004; Brummell, *et al.*, 2004).

Las pectinasas hidrolizan los diferentes tipos de pectinas, liberando ácidos urónicos. La biodegradación de las pectinas se realiza gracias a las pectinasas y específicamente endo-poligalacturonasas, que solo actúan sobre unidades ácidas (no esterificadas). Las unidades esterificadas son degradadas por las metilpectina-esterasas, que permiten adaptar el sustrato para reaccionar con la enzima anterior.

## Capítulo 4

### Propuesta del uso de las enzimas en la hoja de jamaica

#### Perspectivas

De acuerdo con Sumaya (2014), en México el cultivo de la jamaica presenta una baja industrialización, aproximadamente el 95 % del consumo es en forma de cálices deshidratados con un bajo valor en el mercado. Ante este panorama, una estrategia para elevar la competitividad de la jamaica en el mercado nacional e incluso internacional es la implementación de un nuevo concepto dentro de los agronegocios en México. El cual implica la demanda del consumidor para la implementación de este tipo de estrategias de comercialización en forma de productos de alto valor agregado.

El uso de jamaica para la extracción de antocianinas y el desarrollo de nuevos productos permitiría la diversificación de su comercialización, no solo como cálices deshidratados sino como un ingrediente, aditivo natural o excipiente de alto valor para la industria alimentaria.

La jamaica se cultiva para obtener cálices frescos que son posteriormente deshidratados y que se utilizan principalmente para la preparación de bebidas frescas e infusiones. Estas tienen diversos efectos para la salud: bactericidas, antimicóticos, hipocolesterolémicos, diuréticos, antiinflamatorios, antihipertensivos. Como se menciona a lo largo del presente estudio estas se han asociado a la presencia de moléculas con actividad antioxidante. Por ejemplo, polifenoles, quercetina, ácido L-ascòrbico, fibra, vitaminas, minerales, pectinas y principalmente antocianinas.

Como expresa Sumaya (2014), en México tradicionalmente la flor es desechada después de haber realizado la preparación de las bebidas hidratantes y jugos. Al ser implementada esta propuesta da oportunidad de que sus propiedades funcionales puedan ser aprovechadas.

La innovación de productos funcionales, aditivo natural o excipiente de la flor de jamaica podría ser la base para el establecimiento de estrategias comerciales para aumentar su competitividad. El uso de jamaica como extractos antioxidantes naturales como se menciona anteriormente podría ser una valiosa opción como ingrediente en las industrias alimentarias tales como sustitución de colorantes sintéticos, fibra soluble e incluso sustitución de antioxidante sintético tales como BHT, BHA, Y TBHQ (Sumaya Martínez, *et al.*, 2014).

#### **4.1. Propuesta**

En la presente propuesta se sugiere el uso de enzimas con el objetivo de eficientizar el método de extracción de antocianinas en la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*). El principio de acción de las enzimas para la hidrólisis de los componentes que constituyen la pared celular de tejidos vegetales, requiere un ambiente acuoso y un adecuado tiempo de contacto, a temperaturas y pH's apropiados. La mezcla enzimática ideal se determina en base a la composición del componente que se desea extraer el compuesto de interés.

La tabla 13 contiene información de varios autores que determinaron la composición química de la pared celular de la flor de jamaica. Debido a su alto contenido de celulosa (60 al 80%), seguido por hemicelulosa (10 al 17%) y lignina (12 al 16%), se propone el uso de una sinergia entre enzimas celulíticas, con el objetivo de obtener un alto rendimiento de extracción. De acuerdo con Ovando (2005), la aplicación de enzimas celulasas o preparados con actividad enzimática múltiple como celulasa, hemicelulasa y pectinasa, son ideales para la extracción de compuestos de interés, debido a su efecto sinérgico. Adicional y con el objetivo de sostener la propuesta se usaron como referencia las diferentes condiciones que han sido aplicadas en estudios sobre extracción de antocianinas en pétalos de azafrán, melocotón y totomoxtle (Lotfi Kalbasi, *et al.*, 2015; Fernández A., 2012).

Las enzimas endo- $\beta$ -1-4-glucanasa, exo- $\beta$ -1-4-glucanasa y la  $\beta$ -1-4-glucosidasa son aprobadas para el uso en la industria alimenticia. De acuerdo con

la estabilidad de las antocianinas y el medio acuoso idóneo para la mezcla enzimática, es posible hacer uso de las enzimas observadas en la tabla 14: endo-beta-1,4-glucanasa específica de xiloglucano (3.2.1.151), celulasa (3.2.1.4), xilano 1,4-beta-xilosidasa (3.2.1.37),  $\alpha$ -galactosidasa (3.2.1.22),  $\beta$ -glucosidasa (3.2.1.21),  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (3.2.1.55) y la lignino peroxidasa (1.11.1.14).

En la tabla 14 se puede observar las temperaturas y pH's óptimos de las enzimas propuestas para realizar la extracción enzimática de antocianinas. Sus condiciones se encuentran en un rango de 30 a 55 ° C y un pH entre 4.0 a 5.0, información obtenida de la página de datos enzimáticos e información metabólica Brenda, (2021).

Tabla 14. Condiciones óptimas de enzimas (Brenda, 2021).

Componente degradar	a	Enzima	Temperatura óptima	pH
Celulosa	A	endo-beta-1,4-glucanasa específica de xiloglucano (3.2.1.151)	50 - 70	5.0
	B	celulasa (3.2.1.4)	50 - 55	4.5 - 5.0
	C	$\beta$ 1-4-glucosidasa (3.2.1.74)	30 - 35	6.8
Hemicelulosa	D	xilano 1,4-beta-xilosidasa (3.2.1.37)	40 - 60	5.0
	F	$\beta$ -galactosidasa (3.2.1.23) <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	35 - 50	5.0 - 5.5
	G	$\alpha$ -galactosidasa (3.2.1.22) <i>Streptomyces olivaceus</i>	50 - 65	4.5 - 6.5
	H	$\beta$ -glucosidasa (3.2.1.21) <i>Aspergillus niger</i>	60-70	4.6 - 5.3
Lingina / Pectina	I	$\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (3.2.1.55)	35 - 50	5.0 - 6.0
	J	Acetilxilano esterasa (3.1.1.72) <i>Trichoderma reesei</i>	60 - 65	5.0 - 6.0
	K	endo- $\beta$ -1-4-xilanasa (3.2.1.136) <i>Thermomyces lanuginosus</i>	60 - 75	6.0 - 6.5
	L	lignino peroxidasa (1.11.1.14)	45 - 60	4.2 - 4.8

El diagrama de diseño experimental (Figura 24) de la extracción enzimática de antocianinas inicia con la preparación de la muestra. Con base a Daniela E. (2016), el proceso óptimo para deshidratar cálices de flor de jamaica, con el objetivo de evitar la disminución del contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante es a 60 ° C con los cálices enteros. En un tiempo de secado de 7

horas reporta un contenido de polifenoles de 329.99 meq ácido gálico/100 g de muestra seca. De acuerdo con Duque (2007), a menor tiempo de exposición al calor se conserva mejor el color del producto.

Una vez que la muestra se encuentra deshidratada a (60 ° C / 7 h máx.) y molida. Se puede continuar con el pretratamiento enzimático (celulasas, hemicelulasas y pectinasas), las condiciones propuestas para el medio están expuestas en la tabla 15. Cabe resaltar que dependiendo de la mezcla de enzimas seleccionadas de la tabla 15, se seleccionaran las condiciones del medio. El motivo de esto es que a pesar de que las condiciones son similares, existen diferencias significativas. Las mezclas enzimáticas propuestas son 4, a diferentes condiciones teniendo en total 8 propuestas.

## 4.2. Condiciones de la extracción asistida por enzimas

*Tabla 13 Condiciones de la extracción asistida por enzimas.*

Condiciones	Enzimas				(Tanya L. et al., 2018)	(Lotfi L. et al., 2015)
	A/D/I	C/D/L	B/G/L	C/F/I		
Buffer (medio)	Acetatos	Acetatos	Acetatos	Acetatos	-	-
	Citratos	Citratos	Citratos	Citratos		
pH	5.0	4.5	4.5	6.0	-	1
Temperatura (°C)	50	45	50	35	45.63	40
Concentración de enzimas (E/S)	15				12.91	5
Mayor rendimiento vs método convencional (%)					62.9	80

Posterior al tratamiento enzimático, se realiza un centrifugado y filtrado para retirar sólidos producidos en la hidrólisis enzimática de los componentes que constituyen la pared celular de tejidos vegetales. Por último el extracto será



concentrado mediante el método de liofilización<sup>24</sup> para tener un menor riesgo de pérdida de antocianinas por calor. Otro motivo del uso de liofilizado es reducir factores que afecten la pérdida de antocianinas al momento de evaluar el rendimiento del método.

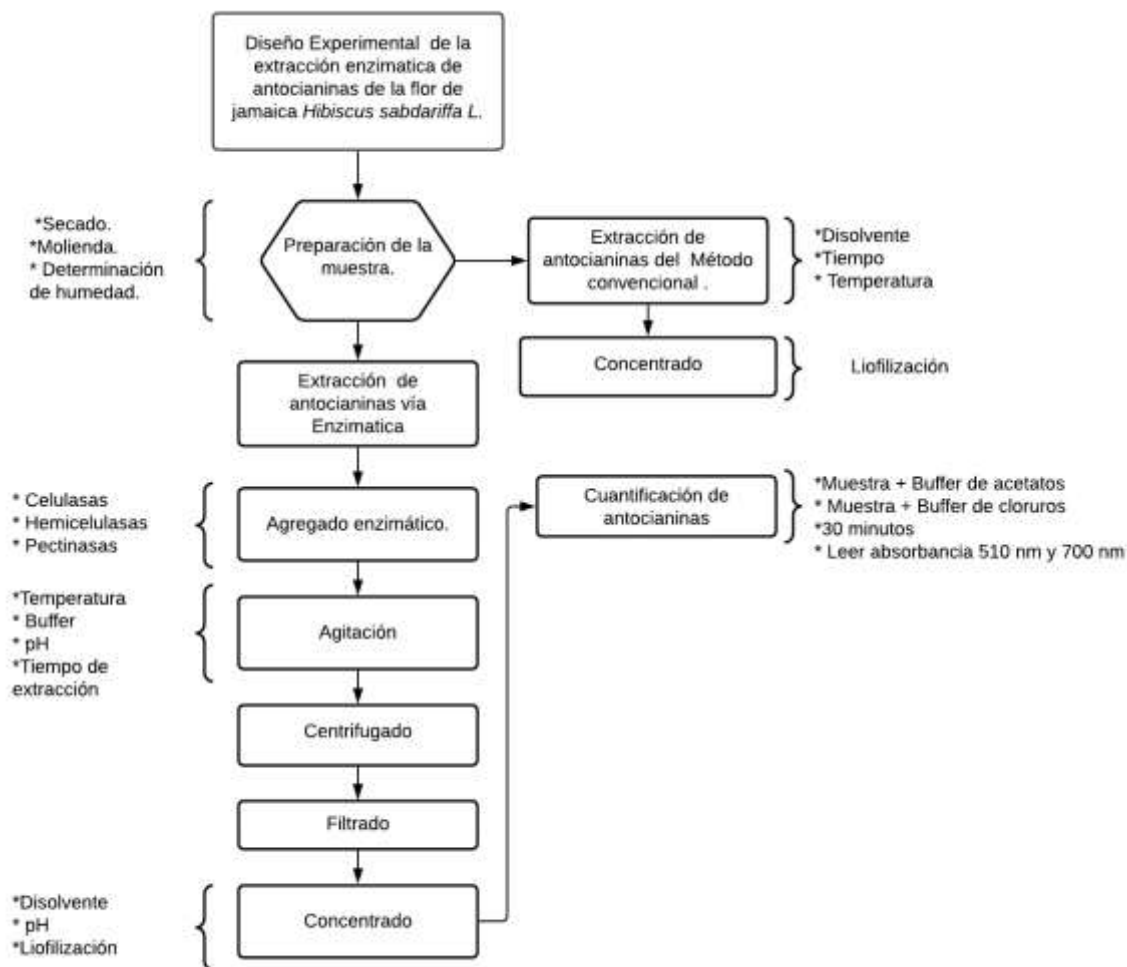


Figura 24 Diagrama de flujo. Propuesta de extracción de antocianinas vía Enzimática.

24 Proceso por el que se separa el agua de una sustancia, o de una disolución, mediante congelación y posterior sublimación a presión reducida del hielo formado, para dar lugar a un material esponjoso que se disuelve posteriormente con facilidad. (Real Academia Española, 2021)

### 4.3. Ventajas y desventajas de la propuesta

De acuerdo con Isabel (2021), las enzimas son biocatalizadores muy específicos, presentan una elevada actividad catalítica y actúan a temperaturas moderadas y presión atmosférica. Además, las reacciones en medios orgánicos presentan numerosas ventajas frente a los medios acuosos: aumentan la solubilidad de algunos reactivos, los productos se pueden aislar con mayor facilidad, la estabilidad enzimática puede estar incrementada y no hay contaminación bacteriana.

Dicho con otras palabras y enfocado a las ventajas de la propuesta, las enzimas se pueden utilizar como herramientas adicionales para procesos regulares. Con el fin de aumentar rendimientos de extracción de compuestos de interés nutracéuticos o para la salud humana provenientes de tejidos vegetales.

Las enzimas parecen ser más eficientes en las mezclas que por separado, ya que muchas de ellas tienen un efecto sinérgico que mejora la extracción comparado con su comportamiento individual.

Una ventaja con la extracción con solventes asistido por enzimas es la posible reducción de la cantidad de solvente utilizada durante la extracción, se podría incluir el uso de una temperatura inferior a la del proceso convencional. Al final de la extracción se puede obtener la menor cantidad de compuestos indeseables y a su vez, el medio acuoso es mucho más seguro, económico y amigable con el medioambiente, permitiendo posibles operaciones flexibles, menor consumo energético y menor inversión de capital. Además, Puri (2012) señala que el uso de enzimas mejora la extracción de compuestos fenólicos de un 32.33 a un 61.90%.

Una desventaja con la extracción asistida con enzimas es que se pueden incluirse los largos periodos de incubación y el costo de energía extra utilizada para los tratamientos de secado adicionales y el costo de la enzima también podría ser considerado como una desventaja.

## Conclusiones

Con relación a lo expuesto en la presente propuesta del uso de una mezcla de enzimas celulíticas para optimizar la extracción de antocianinas. Usando como materia prima la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*), con la finalidad de elevar la competitividad de este recurso en el mercado nacional e incluso internacional. Al difundir información sobre las propiedades nutricionales y funcionales con las que cuenta la flor de Jamaica, su alto contenido de ácidos polifenólicos, flavonoides, antocianinas, fibra, minerales y vitaminas elevamos su valor añadido<sup>25</sup>.

La idea principal es hacer uso de enzimas como un coadyuvante en la degradación de la pared celular de la flor de Jamaica. Como consecuencia incrementar el rendimiento de extracción de antocianinas. Esto permitiría un mayor contacto entre las antocianinas y solvente de extracción, usando condiciones que permitan una buena estabilidad a la molécula de antocianina.

Se espera que la propuesta con las enzimas C/F/I, las cuales involucran temperaturas de 35 ° C y pH de 6.0, sea la que obtenga rendimientos más elevados, seguido de las enzimas que involucran la lignino-peroxidasa. . Analizando las condiciones publicadas por los autores de la tabla 15, quienes hicieron uso de esta técnica de extracción y obtuvieron un incremento en el rendimiento de extracción de hasta un 60 a un 80 %. Se espera igualar e incluso superar valores de rendimiento, debido a que existe un equilibrio entre las condiciones óptimas para las enzimas y la estabilidad de las antocianinas. Incluso se evaluó el tipo de enzimas de acuerdo a la composición química de la pared celular de la flor de Jamaica.

---

25 El conjunto de características adicionales del producto o servicio que se ofrece que hacen que se más atractivo para el cliente frente a la competencia.

## Bibliografía

### Artículos de Revista

Abou Arab, A. A., Abu Salem, F. M., & Abou Arab, E. A. (2011). Propiedades físicoquímicas de los pigmentos naturales (antocianina) extraídos de cálices de Roselle (*Hibiscus Sabdariffa*). *Revista de ciencia americana*, 445-456.

Aguilera Ortiz, M., Reza Vergas, M., Chew Madineveitia, R., & Meza Velázquez, J. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista de ciencias biológicas y de la salud*, 16-18.

Andiz, B. & Feuya, T. (2016). Estudio comparativo de la actividad antioxidante de los polifenoles totales extraídos de *Hibiscus Sabdariffa L.*, *Glycine mas L. Merr.*, té amarillo y vino tinto por reacción con radicales libres DPPH. *Revista árabe de química* 9(1), 1-8.

Atalla, R. (1993). Las estructuras de las celulosas nativas. Simposio internacional sobre química de la madera y la pulpa, 608-614.

Ávalos García, A., & Pérez Urria E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Departamento de Biología Vegetal I, Fisiología Vegetal*, 2(3), 119-145.

Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., & Youssef, M. M. (2012). Aplicaciones de los ultrasonidos en el análisis, procesamiento y control de calidad de alimentos. *Internacional de Investigación Alimentaria*, 48(2), 410-427.

Babalola, S. O., Babalola, A. O., & Aworh, O. C. (2001). Atributos composicionales de los cálices de Roselle (*Hibiscus Sabdariffa L.*). *Revista de Tecnología alimentaria en Africaa*, 6(4), 133-134.

Babbar, N., Oberoi, H. S., Sandhu, S. K. (2015). Potencial terapéutico y nutracéutico de compuestos bioactivos extraídos de residuos de frutas. *Ciencia de los alimentos y nutrición*, 319-337.

Bataille, P. F., & Toussaint, P. (1985). Efecto del pretratamiento sobre la hidrólisis enzimática de residuos industriales celulósicos. *Revista de tecnología química y biotecnología*, 35(3), 205-215.

Batisse, C., Buret, M., & Coulomb, P. J. (1996). Diferencias bioquímicas en la pared celular de la cereza entre fruta blanda y crujiente. *Diario de la química agrícola y alimentaria*, 44, 453-457.

Béguin, P., & Aubert, J. P. (1994). La degradación biológica de la celulosa. *Reseñas de microbiología FEMS*, 13(1), 25-58.

Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Biosíntesis de lignina. *Revisión anual de biología vegetal*, 54, 519-546.

Braidot, E., Zancani, M., Petrusa, E., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., y otros (2008). Transporte y acumulación de flavonoides en vid (*Vitis vinífera L.*). *Señalización y comportamiento de la planta*, 626-632.

Brande Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Uso de un método de radicales libres para evaluar la actividad antioxidante. *Ciencia y tecnología de los alimentos. ELSERVIER*, 25-30.

Brummell, D. A., Dal Cin, V., Crisosto, C. H., & Labavitcj, J. M. (2004). Metabolismo de la pared celular durante la maduración, y senescencia del melocotón. *Revista de botánica experimental*, 55, 3029-3039.

Castañeda Ovando, A., Pacheco Hernández, M. L., Páez Hernández, M. E., Rodríguez, L. A., & Galán Vidal, C. A. (2009). Estudios químicos de antocianinas. *Química de los alimentos*, 113: 859-871.

Chasquibol, S. N., Lengua C. L., Delmás, I., Rivera C., Bazán, D., Aguirre, M. R., y otros. (2003). Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia. Departamento de Química Analítica, Facultad de Química e Ingeniería Química. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 5(2), 9-20.

Chemat, F., Khan, K., & E-Huma, Z. (2011). Aplicaciones de los ultrasonidos en la tecnología alimentaria: Procesado, conservación y extracción. *Ultrasonidos sonoquímica*, 18(4), 813-835.

Correa Cuevas, L. P., & Hernández Baltazas, E. (2011). El uso de microondas en la industria farmacéutica. *Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas*, 42(4), 6-25.

Da Costa Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pishel, I., & Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdariffa L.* Una revisión fitoquímica y farmacológica. *ELSEVIER Química de Alimentos*, 165, 424-443.

Delgado Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes López, O. (2000). Pigmentos naturales: Carotenoides, Antocianinas y Betalainas Características, Procesamiento y Estabilidad. *Revisiones críticas en ciencia de los alimentos y nutrición*, 40(3), 173-289.

Friedman, M. (1997). Química, bioquímica y función dietética de los polifenoles de la patata. Una revisión, *diario de la química agrícola y alimentaria*, 45(5), 1532-1540.

Galicia Flores, L. A., Salimas Moreno, Y., Espinoza García, B. M., & Sánchez Fera, C. (2008). Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*) nacional e importada. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14(2), 1027-1250.

Hahn Hagerdal, B., & Palmqvist, E. (2000). Fermentación de hidrolizados lignocelulósicos II: Inhibidores y mecanismos de inhibición. *Tecnología de fuentes biológicas ELSEVIER*, 74(1), 25-33.

He, B., Ling Li, Z., Xue Yang, Y., Jin, L., Jiang, J., Xue Ling, G., y otros. (2016). Optimización de la extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos y antocianinas de orujo de vino de arándano (*Vaccinium ashei*). *Química de los alimentos ELSEVIER*, 204(1), 70-76.

Hildén, L., & Johansson, G. (2004). Desarrollos recientes sobre celulasas y módulos de unión a carbohidratos con afinidad a la celulosa. *Cartas de biotecnología*, 26(22), 1683-1693.

Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (15 de junio 2011). Una revisión crítica de los métodos para la caracterización de compuestos polifenólicos en frutas y verduras *ELSEVIER*, 126(4), 1821-1835.

Ikehata, K., Buchanan, I D., & Smith, D. W. (2004). Desarrollos recientes en la producción de Peroxidasas y lacasas fúngicas extracelulares para el tratamiento de residuos. *Revista Ciencia ambiental convincente*, 3, 1-19.

Jabeur, I., Pereire, E., Barros, L., Clhelha, R. C., Sokovic, M., Oliveira, B. P., y otros. (2017). *Hibiscus sabdariffa* L. como fuente de nutrientes, compuestos bioactivos y colorantes. *Revisión de comida internacional ELSEVIER*, 100(1), 717-723.

Karakoti, A., Biswas, S., Aseer, R., Sindhu, N., & Sanjay, M. R. (2018). Caracterización de microfibras aisladas de *Hibiscus sabdariffa* var. Alta en fibra por exposición de vapor. *Revista de fibras naturales*, 189-198.

Ladish, M. R., Lin, K. W., Voloch, M., & Tsao, G. T. (1993). Consideraciones de proceso en la hidrólisis enzimática de biomasa. *Tecnología enzimática y microbiana*, 5(2), 82-102.

Lau, J. M., McNeil, M., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1985). Estructura de la columna vertebral de rhamnogalacturanol, un polisacárido péptico en las paredes celulares primarias de las plantas *ELSEVIER Investigación de carbohidratos*, 137, 111-125.

Laureno Pérez, L., Teymopuri, F., Alizadeh, H., & Dale, B. E. (2005). Comprender los factores que limitan la hidrólisis enzimática de la biomasa. *Bioquímica y biotecnología aplicadas*, 1081-1099.

Levy, I., Shani, Z., & Shoseyov, O. (2002). Modificación de polisacáridos y pared celular vegetal mediante dominios de unión a endo-1,4-beta-glucanasa y celulosa. *Ingeniería biomolecular*, 19(1), 17-30.

Lotfi, L., Kalbasi Ashtari, A., Hamedi, M., & Ghorbani, F. (2015). Efectos de la extracción enzimática sobre el rendimiento de antocianinas del tépalo de azafrán (*Crocus sativus*) junto con sus propiedades de color y estabilidad estructural *ELSEVIER. Revista de análisis de alimentos y medicamentos*, 210-218.

Marsden, W. L., Gray, P. P., & Mandels, M. (2008). Hidrólisis enzimática de celulosa en materiales lignocelulósicos. *Revista críticas del CRC en biotecnología*, 3, 235-276.

Martins, N., Lobo Roriz, C., morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2016). Colorantes alimentarios: desafíos oportunidades y deseos actuales de las agroindustrias para garantizar las expectativas del consumidor y las prácticas regulatorias. *Tendencias en ciencia y tecnología de los alimentos*, 52, 1-15.

Martínez, Á. T., Speranza, M., Ruiz Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., y otros. (2005). Biodegradación de lignocelulósicos: aspectos microbianos, químicos y enzimáticos del ataque fúngico de la lignina. *Int. Microbiología*, 8(1), 195-204.

Mercado Mercado, G., De La Rosa Carrillo, L., Wall Medrano, A., López Díaz, J., & Álvarez Parrilla, E. (2012). Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México. *Nutrición hospitalaria. Departamento de Ciencias Químicas biológicas, Departamento de Ciencias de la salud, de Universidad Autonoma de Ciudad Juárez*, 28(1), 36-46.

Musielak, G., Mierzwa, D., & Kroehnke, J. (2016). Mejora del secado de alimentos por ultrasonido: una revisión. *Tendencias en ciencias y tecnología de los alimentos ELSEVIER*, 56, 126-141.

Onggo Holis, K. M., & Syampurwadi, A. (2007). Propiedades físicas y mecánicas de compuestos de polipropileno rellenos de fibra naturales y reciclaje. *Revista de Ciencias Biológicas*, 7(2), 939-396.

Ortiz Martha, L. (2009). Aproximación a la comprensión de la degradación de la lignina. *Orinoquia, Universidad de los Llanos*, 13(2), 137-144.

Ovando Chacòn, S. L., & Waliszewski, K.N. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21(42), 113-122.

Pare, J. J., Bèlanger, J. M., Thornton, D. E., Li, K., Llompart, M. P. Fingas, M., y otros. (1997). Método de extracción en fase gaseosa mediante el proceso asistido por microondas (MAP) para la determinación de contaminantes aromáticos en el suelo. *Espectros An int*, 13, 23-32.

Peng Kong, Wong Salmah, Yusof, Ghazali, H. M. Y. B., (2002). Características fisicoquímicas de la Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Revista Nutrición y ciencia de los alimentos*, 32(2), 68-70.

Peñarrieta, J. M., Alvarado, J. A., Akesson, B., & Bergentahl, B. (2008). Capacidad antioxidante total y contenido de flavonoides y otros compuestos fenólicos en canihua (*Chenopodium pallidicaule*): un pseudocereal andino. *Nutrición molecular e investigación alimentaria*, 708-717.



Pérez, J., Muñoz Dorado, J., De La Rosa, T., & Martínez, J. (2002). Biodegradación y tratamientos biológicos de celulosa, hemicelulosa y lignina; una visión general. *Microbiología Internacional*, 5, 53-63.

Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. (2012). Extracción de bioactivos de plantas asistida por enzimas. *Tendencias en biotecnología*, 30(1), 37-44.

Quintanar Escorza, M. A., & Calderón Salinas, J. V. (3 de septiembre de 2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Revista de educación Bioquímica*, 28(3), 89-101.

Quiroz, A., Palafox, H., Robles, R., & González, G. (2012). Interacción de compuestos fenólicos y fibra dietaria: Capacidad antioxidante y biodisponibilidad. *Revista de Ciencias biológicas y de la salud*, 13, 3-11.

Quiroz Castañeda, R. E., & Flich MMollo, J. L. (2011). Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales. *Laboratorio de Biología Molecular de Hongos, Centro de Investigación en Biotecnología*, 28(1) 194-204.

Rasha, K. M., Ahmed, Y. G., Nagwa, M. R., & Ferial, M. A. S. (oct-dic de 2016). Extracción de pigmentos de Antocianinas de *Hibiscus sabdariffa* L. y evaluación de su actividad antioxidante. *Ciencias*, 6, 856-866.

Redwell, R. J., Fisher, M., Kendal, E., & MacRae, E. A. (1997). Pérdida de galactosa y maduración del fruto: arabinogalactanos de alto peso molecular en los polisacáridos pécticos de las paredes celulares del fruto. *Planta* (203), 174-181.

Rodríguez Perón, J. M., Menéndez López, J. R., & Trujillo López, Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 30, 15-20.

Salazar González, C., Vergara Balderas, F. T., Ortega Regules, A. E., & Guerrero Beltran, J. A. (2012). Propiedades antioxidantes y color de los extractos de *Hibiscus sabdariffa*. *Ciencia e innovación agraria*, 1, 79-90.

Sánchez, Carmen. (2009). Residuos lignocelulósicos: biodegradación y bioconversión por hongos. *Avances en biotecnología ELSEVIER*, 27(2), 185-194.

Sánchez, Juan Rocío. (2013). La Química del color en los alimentos. *Química Viva*, 235-246.

Saura Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Ingesta y bioaccesibilidad de polifenoles totales en una dieta completa. *Química de Alimentos ELSEVIER*, 101(2), 492-501.

Sáyago Ayerdi, S. G., & Goñi, I. (2010). *Hibiscus sabdariffa L.*: Fuente de fibra antioxidante. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 60(1).

Shirsath, S. R., Sonwane, S. H., & Gogate, P. R. (2012). Intensificación de la extracción de productos naturales mediante irradiaciones ultrasónicas: una revisión del estado actual. *Procesamiento e ingeniería química: intensificación de procesos ELSEVIER*, 53, 10-23.

Suliman, A. M., Ali, O., Idriss, S. E., & Abdualrahmn, M. A. (2011). Un estudio comparativo sobre los cálices, extractos y sus productos de karkade rojo y blanco (*Hibiscus sabdariffa L.*). *Revista de Nutrición de Pakistán*, 10(7), 680-683.

Sumaya Martínez, M. T., Medina Carrillo, R. E., Machuca Sánchez, M. L., Jiménez Ruiz, E., Balois Morales, R., & Sánchez Herrera, L. M. (2014). Potencial de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*) en la elaboración de alimentos funcionales con actividad antioxidante. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 35, 1082-1088.

Swier, T. L., Mukhim, C., Bashir, K., & Chauhan, K. (2018). Optimización de la extracción asistida por enzimas de antocianinas de *Prunus nepalensis L.* *LWT-Ciencia y tecnología de los alimentos ELSEVIER*, 31, 328-390.

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). Bioaccesibilidad in vitro y actividad antioxidante de los polifenoles de la uva. *Química de los alimentos ELSEVIER*, 120, 599-606.

Tamta, M., & Baishya Kalita, B. (2020). Estudio comparativo de las propiedades fisicoquímicas de la roselle (*Hibiscus sabdariffa L.*) y la fibra de ramio. *Academia Internacional de ciencias, Ingeniería y Tecnología*, 9(6), 21-28.

Vilier, A., Lynen, F., Sandra, P., & Crouch, A. (2004). Desarrollo de un procedimiento de extracción en fase sólida para la determinación simultánea de polifenoles, ácidos orgánicos y azúcares en el vino. *Cromatografía*, 59, 403-409.

Waldron, K., Smith, A. C., Parr, A. J., & Parker, M. L. (1997). Nuevos enfoques para comprender y controlar la separación celular en relación con la estructura de frutas y hortalizas. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 213-221.

Yang, Zhang, Butelli Eugenio, Martín Cathie. (2014). Ingeniería de la biosíntesis de antocianinas en plantas. Opinión actual en biología vegetal ELSEVIER, 81-90.

## **Tesis**

Andrade Encarnación, D. G. (2015). Obtención de colorante rojo a partir del exoesqueleto de camarón. *Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniería Química. Universidad Técnica de Machala. Unidad académica ciencias químicas y de la salud* , 19-22.

Carranza Rodríguez, A. (2013). Obtención de glucosa a partir de aserrín de encino pre tratado con reactivos alcalinos, seguido por hidrólisis enzimática. *Tesis para obtener grado de Maestro en ciencias y Tecnología Ambiental. Centro de Investigación en Materiales Avanzados S.C* , 32-38.

Cañada Blanca David. (2019). Determinación de la composición química y la capacidad antioxidante de un complemento alimenticio basado en la hoja de olivo. Trabajo de Fin de Grado en Química. Universidad de Jaén. Facultad de Ciencias Experimentales, 10-15.

Cevallos Mina, M. G. (2015). Procesamiento de la flor de jamaica (*Hibiscus Sabdariffa*) desecado para la preparación de Yogurt y bebida con altas propiedades nutraceuticas. *Trabajo de titulación previa a la obtención del título de Ingeniero Químico. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ingeniería Química*, 7-29.

Chávez Miranda, A. M. (2014). Evaluación de la estabilidad de las antocianinas aciladas obtenidas del camote morado, el rábano y la campanilla roja. *Facultad de Química, UNAM. Tesis para obtener el título de Química de alimentos*, 1-85.

Erazo Sánchez, D. A. (2016). Estudio del efecto de la deshidratación por aire sobre la capacidad antioxidante de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*) . *Trabajo previo a la obtención del título de ingeniería de alimentos. Universidad Tecnológica ecuinoccial*, 60-64.

Fernández Aulis, F. M. (2012). Aplicación de tecnologías emergentes para extracción óptima de antocianinas del totemoxtle y olote de maíz criollo morado. *Tesis para obtener el título de Licenciado en Química de Alimentos. UNAM Facultad de Química.*

Huet Breña Cristina. (2017). Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas. Trabajo de Fin de grado. Universidad Complutense. Facultad de Farmacia, 11-15.

Guerrero Cázares, Z. (2018). Caracterización fitoquímica y funcional de extractos de cálices de diversos genotipos de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Tesis para obtener el grado de maestra en ciencias en el área de biotecnología vegetal. Universidad Autonoma de Aguascalientes, 14-50.*

Rodriguez , L. M. (2019). Aplicación de enzimas en la obtención de aceite de girasol con solventes renovables: Impacto del procesamiento en la composición y calidad de aceites y harinas. *Tesis de doctor en ciencias y tecnología de alimentos. Universidad Nacional del Sur, 26-55.*

### **Páginas de Internet**

Acosta, B. (31 de julio de 2021) Ecología Verde. Recuperado del 2021, de Tipos de flor de jamaica, Obtenido de: <https://www.ecologiaverde.com/tipos-de-flor-de-jamaica-3465.html>

Alimentarias., P. p. (1997). *SECCION I*. Recuperado el 11 de 08 de 2021, de Definiciones para los fines del codex alimentarius, Obtenido de: <http://www.fao.org/3/w5975s/w5975s00.htm#Contents>

Álvarez, D. O. (15 de Julio de 2021). *Concepto de*. Recuperado el 18 de agosto de 2021, Obtenido de : <https://concepto.de/hidrolisis/>

Brenda. (1 de Febrero de 2021). *Brenda Suport*. Obtenido de El sistema integral de información enzimática, Obtenido de: <https://www.brenda-enzymes.org/index.php>

Castroviejo Fernández, M. P. (2020 de Marzo de 4). *Cromatografía de gases/líquidos acoplado a espectrometría de mesas de alta resolución (MS-AR)*,

Obtenido de Universidad de Burgos: <https://www.ubu.es/parque-cientifico-tecnologico/servicios-cientifico-tecnicos/espectrometria/cromatografia-de-gases-liquidos-acoplado-espectrometria-de-masas-de-alta-resolucion-ms-ar>

De la Mata, I. (2021). *COMPLUTRANSFER*. Obtenido de Biotecnología enzimática y biotransformaciones de interés industrial, Obtenido de: <https://www.ucm.es/otri/complutransfer-biotecnologia-enzimatica-y-biotransformaciones-de-interes-industrial>

Dicciomed. (agosto de 2021). *Diccionario médico-biológico, histórico y etimológico*, Obtenido de <https://dicciomed.usal.es/palabra/liofilizacion#:~:text=f.,se%20disuelve%20posteriormente%20con%20facilidad.>

Duke, J. A. (1983). *Hibiscus sabdariffa L.* Recuperado el 17 de Febrero de 2021, de Malvaceae Roselle Manual de cultivos energéticos, Obtenido de: [http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke\\_energy/Hibiscus\\_sabdariffa.html#Chemistry](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Hibiscus_sabdariffa.html#Chemistry)

E. Coto, C. (2003). *Enzimas*. Recuperado el septiembre de 2021, de Curso de Introducción al Conocimiento Científico Experimental, Obtenido de: <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/contratapa/aprendiendo/capitulo18.htm>

Escudero Gilete, M. L., & Vicario Romero, I. M. (2017). Colorantes alimentarios. En: Inmaculada Mateos-Aparicio. En *Aditivos Alimentarios* (págs. 109-142). Madrid España: Dextra. Obtenido de: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Poster/MARTA%20CALVO%20DOMPER.pdf>

Farbe Naturals. (2021). Tipos de colorantes artificiales para alimentos y sus usos. Recuperado el 03 de noviembre de 2021, Obtenido de: <https://farbe.com.mx/tipos-de-colorantes-artificiales-para-alimentos-y-sus-usos/>

Fennema, O. R. (2000). *Química de los Alimentos*. Recuperado el 14 de septiembre de 2021, Obtenido de: <https://sceqa.files.wordpress.com/2014/05/qc3admica-de-los-alimentos-fennema.pdf>

Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J. M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N., y otros. (2006). *Genética y Bioquímica de flavonoides de semillas*. Obtenido de

Revisión anual de biología vegetal, Obtenido de:  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105252>

Menéndez Valderrey, Juan Luis. (Abril de 2014). "Los disacáridos". Asturnatura.com. Recuperado el Abril de 2021, Obtenido de:  
<https://www.asturnatura.com/articulos/glucidos/disacaridos.php>

Mordor, I. (Febrero de 2021). *Mercado de antocianinas: Crecimiento, tendencias, impacto de covid-19 y pronósticos (2021-2026)*. Recuperado el 09 de Abril de 2021, de Mordor Intelligence, Obtenido de:  
<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/anthocyanin-market>

Morton, J. F., & Miami, F. L. (1987). *Roselle (Hibiscus sabdariffa L.)*. Recuperado el 17 de Febrero de 2021, de Frutos de climas cálidos, Obtenido de:  
<https://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/roselle.html>

Ramírez Ramírez, J., & Ayala Aceves, M. (1 de noviembre de 2014). *Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan?* Obtenido de:  
<http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/index.html>

Real Academia Española. (2021). Diccionario de la lengua española. Obtenido de: <https://dle.rae.es/liofilizar>

Salinas Moreno, Y., Soria Ruiz, J., & Espinosa Trujillo, E. (Diciembre de 2010). *Aprovechamiento y Distribución de maíz Azul en el Estado de México*. Obtenido de ResearchGate:  
[https://www.researchgate.net/publication/319234010\\_Aprovecha](https://www.researchgate.net/publication/319234010_Aprovecha)

## Libros de Internet

Brouillard, R. (1982). Estructura de antocianinas, Capitulo 1. En P. Markakis (Ed.), *Antocianinas como colorantes alimentarios* (págs. 1-40). Nueva York: Elsevier,2012.

Larousse. (2009). *Diccionario Encicloédica*. Recuperado el 19 de 08 de 2021, de polimerización, Obtenido de:  
<https://es.thefreedictionary.com/polimerizaci%c3%b3n>

Zarra, Ignacio; Revilla, Gloria;. (1993). Fisiología vegetal. Introducción a las células de las plantas: membrana y pared. En j. Azcón bieto, & Manuel Talón,

*Fundamentos de Fisiología Vegetal* (págs. 20-39). Interamericana España  
(Madrid): Mc Graw Hill Education.

## Anexo

### Contenido de Figuras

<i>Figura 1. Antocianinas en el reino vegetal. ....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 2. (1) Cation Flavilio; (2) Pelargonidina (antocianidina); (3) Pelargonidina-3-O-glucósido (antocianina). ....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 3 Estructura general de los flavonoides proveniente de los productos de la ruta del ácido shikimico y el ácido malónico. La numeración es de acuerdo a la posición de los sustituyentes de cada flavonoide. ....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 4 Rutas de síntesis de compuestos fenólicos. (Ávalos-García, et al., 2009 modificado). ....</i>	<i>18</i>
<i>Figura 5 Ruta general de biosíntesis de las antocianinas. (Ávalos-García, et al., 2009 modificado). ....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 6 Estructura molecular de algunas antocianidinas comunes. ....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 7 (a) Cianidina; (b) Crisantemina (cianidina-3-O-glucósido); (c) cianidina-3,5-O-diglucósido. ....</i>	<i>221</i>
<i>Figura 8 Estructura de la delfidina-3-malonilglucosido. ....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 9 Ácidos cinámicos comúnmente acilados con los residuos de azúcar de las antocianinas. ....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 10 . Ácidos alifáticos comúnmente acilados con los residuos de azúcar de las antocianinas. ....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 11 Transformaciones moleculares en función del pH para la cianidina. ....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 12 Mapa del tamaño del mercado de las antocianinas por región mundial en el 2018. ....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 13Reacción del complejo cromóforo de hierro tras actuar el oxidante. ....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 13.1 Estructura química del ABTS. ....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 13.2 Estructura de ABTS antes y después de la reacción con el antioxidante . ...</i>	<i>38</i>
<i>Figura 14 Estructura química del radical libre metaestable DPPH . ....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 14.1 Reacción entre el radical DPPH y un antioxidante . ....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 15 Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de compuestos fenólicos asociados a la fibra. ....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 16 Representación esquemática de la estructura de las antocianinas presentes en el pigmento de flor de Jamaica. A) cianidina-3-sambubiosido y B) delfidina-3-sambubiosido. ....</i>	<i>48</i>



Figura 17 Principales antocianinas en un extracto de etanol: agua (50: 50%, v / v) de la flor de Jamaica, evaluado por HPLC a 520 nm. A) delphinidin-3-O-sambubiósido, B) delphinidin-3-O-glucósido y C) cianidin-3-O-sambubiósido.....	49
Figura 18 Delphinidina-3-glucosido.....	52
Figura 19 Cianidina-3-glucosido.....	52
Figura 20 Representación esquemática de la localización de antocianinas a nivel subcelular. ....	53
Figura 21 Composición de la pared celular vegetal. Formada básicamente por los polímeros de celulosa, hemicelulosa, pectina y el polímero fenólico de la lignina. (Rosa E., et al., 2001).....	54
Figura 22 Estructura de los principales biopolímeros que forman la pared celular vegetal. A) Estructura del homopolisacárido de la celulosa cristalina y amorfa. B) Estructura del heteropolisacárido de la hemicelulosa, formada por pentosas y hexosas. C) Estructura de la lignina, formada por la polimerización de tres alcoholes fenólicos. (Rosa E., et al., 2001) .....	57
Figura 23 . Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa. (Paredes, 20120). ....	64
Figura 24 Diagrama de flujo. Propuesta de extracción de antocianinas vía Enzimática..	71

## Contenido de Tablas

Tabla 1: Las enzimas participantes en la ruta del ácido shikimico. (Zhang et al., 2014)...	19
Tabla 2 Contenido de antocianinas con diferentes concentraciones de solventes acidificados. (Rasha K, et al., 2016 modificado).....	29
Tabla 3 Condiciones con diferentes condiciones utilizadas por diferentes autores para la identificación de antocianinas por HPLC – MS.....	35
Tabla 4. Contenido de antocianinas y actividad antioxidante de extracto de Hibiscus con diferentes concentraciones de solventes acidificados. (Rasha K, et al., 2016 modificado). ....	41
Tabla 5. Composición química en macronutrientes para 100 g de la porción comestible de la jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) referida a varios autores. ....	44
Tabla 6. Composición nutricional de cáliz de jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.). (Jabeur et al., 2017).....	45
Tabla 7. Principales constituyentes de extracto acuoso de cáliz de jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.). (Da-Costa-Rocha, et al., 2014).....	46

Tabla 8. Contenido de aminoácidos (mg/g de materia seca) de cáliz de jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.).....	48
Tabla 9. Contenido en compuestos polifenólicos de cálices de la flor de Jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L) (g/100 g de materia seca) (Sayago A., et al., 2007).....	50
Tabla 10. Antocianinas en mg/ 100 g base seca de cáliz jamaica ( <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) referida a varios autores. ....	51
Tabla 11. Caracterización de antocianinas extraídas de cálices de la flor de jamaica. (Salazar-González, et al., 2012). ....	51
Tabla 12. Composición proximal y propiedades fisicoquímicas de flores <i>Hibiscus</i> secas. (Rasha K, et al., 2016).....	55
Tabla 13. Composición química de la pared celular de la flor de jamaica. ....	55
Tabla 14. Condiciones óptimas de las enzimas. ....	69
Tabla 15. Condiciones de la extracción asistida por enzimas .....	70